

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTOS BIOLÓGICOS DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE
50 Hz Y 2.45 GHz Y SU POSIBLE SINERGISMO CON LA
SOBRECARGA ORGÁNICA DE HIERRO Y PLOMO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María del Mar Pérez Calvo

Bajo la dirección de los doctores

Bartolomé Ribas Ozonas

Luis Pablo Rodríguez Rodríguez

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1711-X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL
María del Mar Pérez Calvo

**EFFECTOS BIOLÓGICOS DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE
50 Hz Y DE RADIOFRECUENCIA (2,45 GHz), Y SU
POSIBLE SINERGISMO CON LA SOBRECARGA
ORGÁNICA DE HIERRO Y PLOMO**

Departamento de Toxicología Ambiental
Instituto de Salud Carlos III
Ministerio de Sanidad y Consumo

Madrid, 2002

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.	1
I.1.- PLANTEAMIENTO.	1
I.2.- ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.	4
I.3.- OBJETIVOS.	11
I.4.- PLAN DE TRABAJO.	12
II.- ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA.	18
II.1.- CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS. GENERALIDADES.	18
II.1.1.- El electromagnetismo: visión histórica.	18
II.1.2.- El espectro de la radiación electromagnética: radiaciones ionizantes y no ionizantes.	20
II.1.2. a.- Radiaciones ionizantes.	23
II.1.2. b.- Radiaciones no ionizantes. Efectos biológicos.	25
II.1.3.- Campos electromagnéticos: aspectos generales. Unidades. Principios de acción biofísica.	29
II.2.- CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE FRECUENCIA INFERIOR A LA RADIOFRECUENCIA.	33
II.2.1.- El sistema eléctrico y su relación con los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia.	35
II.2.2.- Revisión de bioefectos relevantes para exposiciones a frecuencias de 0 Hz a 100 kHz.	39
II.2.2.a.- Epidemiología de cáncer y enfermedades neurodegenerativas en humanos.	39
II.2.2.b.- Datos experimentales sobre efectos cancerígenos.	41
II.2.3.- Uso médico de los campos electromagnéticos.	45
II.2.3.a.- Magnetoterapia.	45
II.2.3.b.- Efectos terapéuticos de los campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia.	47

II.3.- CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RADIOFRECUENCIA.	52
II.3.1.-Radiaciones de radiofrecuencia de antenas de telefonía: la transmisión de información por medio de ondas electromagnéticas. ...	57
II.3.1.a.- Las antenas de telefonía móvil.	58
II.3.1.b.- Las estaciones de telefonía móvil.	58
II.3.2.- Revisión de bioefectos relevantes para exposiciones a frecuencias de 100 kHz a 300 GHz.	61
II.3.2. a.- Epidemiología del cáncer en humanos.	61
II.3.2. b.- Datos experimentales.	64
II.4.- UNIDADES Y DOSIMETRÍA. NORMATIVA.	73
II.5.- FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LA PARTE EXPERIMENTAL. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (BHE).	84
II.5.1.- Base morfológica de la barrera hematoencefálica.	87
II.5.2.- Mecanismos de transporte.	91
II.5.3.- Barrera enzimática.	95
II.5.4.- Presencia de fármacos en el líquido cefalorraquídeo.	98
II.6.- ASPECTOS QUÍMICOS: INCIDENCIA ECOTOXICOLÓGICA DE METALES EN POBLACIONES HUMANAS.	102
II.6.1.- Consideraciones generales sobre los aspectos funcionales de los elementos traza.	102
II.6.1.a.- Fuentes de contaminación metálica.	104
II.6.1.b.- Mecanismos de toxicidad.	106
II.6.2.- El plomo: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos.	111
II.6.2.a.- Caracterización: propiedades físico-químicas. Presencia en el medio.	111
II.6.2.b.- Fuentes de contaminación ; vías de exposición.	113
II.6.2.c.- Toxicidad: metabolismo; mecanismos de acción. Órganos afectados.	117
II.6.3.- El hierro: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos.	132
II.6.3.a.-Caracterización: propiedades físico-químicas. Presencia en el medio.	132
II.6.3.b.- Metabolismo: dinámica del hierro en el organismo.	135
II.6.3.c.- Toxicidad. Mecanismos de acción.	142
II.6.3.d.- Ferromagnetismo y paramagnetismo.	148

III.- MATERIAL Y MÉTODOS.	152
III.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS CÁMARAS GENERADORAS DE CAMPOS MAGNÉTICOS UTILIZADAS EN LA PARTE EXPERIMENTAL.	152
III.1.1.- Cámara de generación de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50Hz) e intensidad variable, empleada en los estudios <i>in vitro</i>	153
III.1.1.a.- Diseño y caracterización.	153
III.1.1.b.- Calibración de la cámara.	156
III.1.2.- Cámara de generación de campos magnéticos de 27,5 Oersted, con frecuencia de 50Hz, utilizada en los estudios <i>in vivo</i>	157
III.1.3.- Descripción de la cámara generadora de campos electromagnéticos de radiofrecuencia.	161
III.1.3.a.- Diseño de la célula de medida.	161
III.1.3.b.- Determinación de la permitividad dieléctrica compleja.	165
III.2.- COMPUESTOS METÁLICOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>.	166
III.3.- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>.	168
III.3.1.- Estudio del efecto de campos magnéticos en sistemas celulares y su posible sinergismo con plomo y hierro.	168
III.3.1.a.- Linfocitos: obtención y cultivo.	169
III.3.1.b.- Exposición de los cultivos celulares al campo magnético a estudio.	177
III.3.1.c.- Determinación de proliferación celular: el método del MTT.	178
III.3.1.d.- Determinación de inestabilidad genética mediante el ensayo homologado de micronúcleos con bloqueo citogenético (BC). .	181
III.3.2.- Estudio del efecto de campos magnéticos en tejido sanguíneo humano.	185
III.3.2.a.- Obtención de sangre humana.	186
III.3.2.b.-Incubación de la sangre en presencia del campo magnético a estudio a diferentes tiempos.	186
III.3.2.c.-Determinación de parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo.	187

III.4.- EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>.	192
III.4.1.- Estudio de las variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, originadas por la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz).	192
III.4.1.a.- Animales de experimentación.	193
III.4.1.b.- Disolución del compuesto metálico Pb (NO ₃) ₂ y administración.	194
III.4.1.c.- Exposición de los animales a la acción del campo magnético a estudio.	194
III.4.1.d.- Disección y muestreo. Cuantificación espectrofotométrica.	195
III.4.2.- Determinación de las alteraciones de las propiedades eléctricas de tejidos de rata mediante irradiación con campos electromagnéticos de radiofrecuencia.	198
III.4.2.a.- Animales de experimentación.	199
III.4.2.b.- Administración de los compuestos metálicos.	200
III.4.2.c.- Análisis de sangre de las ratas tratadas con metales.	205
III.4.2.d.- Determinación de la acumulación de metal en los órganos: ICP-MS.	207
ICP-MS: bases de la técnica.	209
III.4.2.e.- Determinación de la permitividad dieléctrica compleja en los tejidos a estudio.	215
III.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	217
IV.- RESULTADOS.	220
IV.1.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> REALIZADOS.	220
IV.1.1- Resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos en sistemas celulares y su posible sinergismo con plomo y hierro.	220
IV.1.1.a- Resultados obtenidos en la determinación de proliferación celular mediante el método del MTT.	220
IV.1.1.b.- Resultados obtenidos en la determinación de inestabilidad genética mediante el ensayo homologado de micronúcleos con bloqueo citogenético (BC).	234
IV.1.2.- Resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos sobre tejido sanguíneo humano.	241

IV.1.2.a.-Resultados de la determinación de parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo.	241
IV.1.2.b.-Estudio comparativo de parámetros enzimáticos y bioquímicos de suero sanguíneo en función del campo magnético aplicado.	257
IV.2.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> REALIZADOS.	263
IV.2.1- Resultados obtenidos en el estudio de las variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, originadas por la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia.	263
IV.2.2.- Resultados obtenidos en la determinación y estudio de alteraciones en las propiedades eléctricas de tejidos de rata mediante irradiación con campos electromagnéticos de radiofrecuencia.	269
IV.2.2.a.- Resultados de los análisis de sangre de las ratas tratadas con metales.	270
IV.2.2.b.- Resultados de la determinación de acumulación de metal en los órganos de ratas tratadas, mediante ICP-MS.	276
IV.2.2.c.- Resultados de la determinación de la permitividad dieléctrica compleja en los tejidos a estudio mediante radiofrecuencia. .	282
V.- DISCUSIÓN.	294
V.1.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>.	294
V.1.1.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) en sistemas celulares y su posible sinergismo con plomo y hierro.	294
V.1.1.a.- Efectos del campo magnético de 50 Hz sobre la proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo.	297
V.1.1.b.- Efectos del campo magnético de 50 Hz sobre el material genético de linfocitos humanos en cultivo.	303
V.1.2.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) sobre tejido sanguíneo humano.	310

V.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>.	317
V.2.1.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de las variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, originadas por la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia.	318
V.2.2.- Discusión de los resultados obtenidos en la determinación y estudio de alteraciones de las propiedades eléctricas de tejidos de rata mediante irradiación con campos electromagnéticos de radiofrecuencia.	329
V.3.- VALORACIÓN CRÍTICA.	345
VI.- CONCLUSIONES.	349
BIBLIOGRAFÍA.	356
ANEXO I.	393
ANEXO II. APÉNDICE DOCUMENTAL.	405

SIGLAS

AA	Absorción Atómica
BHE	Barrera Hematoencefálica
CEM	Campo Electro-Magnético
CUE	Consejo de la Unión Europea
ELF (FEB)	Extremely Low Frequency (Frecuencia Extremadamente Baja)
FCC	Comisión Federal de Comunicaciones, EEUU
GSM	Global System for Mobile Communications
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICNIRP	International Commission on Non- Ionizing Radiation Protection
ICP	Plasma de Acoplamiento Inductivo (Inductively Coupled Plasma)
LCR	Líquido Cefalo-Raquideo
MMP	Metaloproteinasas de Matriz (Matrix Metalloproteinases)
MPE	Exposición Máxima Permisible
NCRP	National Council on Radiation Protection and Measurements
OMS (WHO)	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
RF	Radio Frecuencia
RNI	Radiaciones No Ionizantes
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SAR	Tasa de Absorción Específica (Specific Absorption Rate)
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
TIMP	Inhibidores de Metaloproteinasas (Tissue Inhibitors to Metalloproteinases)

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- PLANTEAMIENTO

El “electrosmog” o contaminación por radiaciones de campos electromagnéticos define un tipo de contaminación invisible y omnipresente que parece ser, o así lo sostiene una parte de la doctrina, la causa oculta de muchas dolencias inexplicables para los médicos, al tratarse de un tipo de contaminación que invade día y noche nuestro hábitat, cuyos efectos reales son desconocidos, al existir numerosos estudios contradictorios en la materia.

En principio, se puede afirmar que existe una adaptación anatómica y estructural a aquellos campos electromagnéticos externos provenientes de emisores naturales como el sol o el campo magnético terrestre, al constituir éstos los únicos a los que los seres vivos, en su desarrollo y procesos de adaptación al medio, han estado sometidos. Sin embargo, el descubrimiento de las leyes de la electricidad y el magnetismo han propiciado, desde principios del siglo XIX hasta la actualidad, la creación y desarrollo de tecnologías, fundamentadas en las mencionadas leyes, que han promovido una transformación radical de nuestro entorno y hábitos de vida: desde la utilización de la electricidad para la iluminación y calefacción de nuestras viviendas, hasta el funcionamiento de la práctica totalidad de las fábricas y empresas, pasando por la evolución de los medios de transporte y comunicaciones. El uso de los campos electromagnéticos forma hoy parte de nuestra vida cotidiana.

La pregunta suscitada hace varias décadas, y que cada día cobra mayor relevancia por la percepción social de un posible riesgo, es si el constante y abrumador uso de aparatos basados en la electricidad, así como los medios para producir y transportar la energía eléctrica, influyen en nuestro entorno de un modo negativo, y si esa influencia puede llegar a afectar a la salud humana. Es decir, hasta qué punto el uso indiscriminado de aparatos relacionados con el electromagnetismo puede afectar al desarrollo ordenado de la vida en el planeta, contaminándolo de forma irreversible, al haberse puesto en circulación en breve espacio de tiempo una enorme cantidad de nuevas emisiones electromagnéticas de diversas frecuencias y tipos de onda a las que los seres vivos no se encuentran adaptados.

La preocupación por la salud humana y los factores que pueden influir en ella ha hecho que, desde los años sesenta, se hayan llevado a cabo multitud de estudios encaminados a determinar si la exposición a los campos eléctricos y magnéticos generados por las instalaciones eléctricas podría suponer algún tipo de riesgo para la salud. En los últimos años esta preocupación se ha extendido a todo el espectro de radiaciones electromagnéticas no ionizantes (RNI, de 0 Hz a 300 GHz), sobre todo a las empleadas por equipos de uso cotidiano, como los electrodomésticos o los teléfonos móviles y sus antenas de estaciones base instaladas en las azoteas de los edificios.

La información que en la actualidad poseemos sobre los efectos biológicos de las exposiciones a radiaciones no ionizantes es todavía limitada e incompleta.

Debido a la presión social, e incluso política, determinados países y organismos científicos internacionales han creído conveniente establecer algún tipo de normativa sobre exposición a los campos electromagnéticos.¹ En muchas ocasiones dicha normativa ha sido establecida simplemente para tranquilizar a la población, que demandaba de la Administración una respuesta clara y concisa a la pregunta de si estaban expuestos a niveles de campo potencialmente peligrosos.

De hecho, se ha ido gestando en los últimos años una auténtica alarma social en relación con los efectos de los CEM en la salud pública, no del todo injustificada y en cuyo origen figuran numerosos informes negativos (que a su vez motivaron otros muchos positivos, como expondremos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral) que, sobre todo desde los años setenta, han ido alcanzando a la opinión pública a partir de instancias de tipo científico. La inquietud suscitada en la sociedad por esta polémica exige, tanto por parte de la comunidad científica como de las Administraciones Públicas –estas últimas como garantes que son del derecho a la protección de la salud que recoge la Constitución en su artículo 43-,² una respuesta rápida al problema que plantea este tipo de radiaciones por sus posibles efectos sobre la salud humana.³

¹ Así, en España, acaba de aprobarse el Real Decreto 1066/2001, de fecha 28 de Septiembre, sobre límites de exposiciones radioeléctricas.

² En efecto, la Constitución Española de 1978, en su artículo 43 reconoce el derecho a la protección de la salud y señala que “compete a los Poderes Públicos organizar y tutelar la Salud Pública a través de medidas preventivas y de las prestaciones y servicios necesarios”.

³ Ya que la inquietud social que sobre los campos electromagnéticos existe en la actualidad nos parece de por sí motivo suficiente para justificar el presente trabajo, en el Anexo I profundizamos en la percepción social del problema, refiriendo las últimas noticias que, reflejando dicha alarma, vienen apareciendo en los distintos medios de comunicación cada vez con más frecuencia, así como exponiendo la jurisprudencia que se ha generado al respecto.

I.2.- ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

Resulta ineludible apuntar, aunque sea brevemente, unas ligeras ideas sobre las fuentes que hemos empleado en la realización del presente trabajo, así como adelantar, ya desde ahora, el método que hemos de seguir, en tanto que ello redundará en una más fácil comprensión de los resultados a que hemos llegado en nuestra investigación. En posteriores capítulos se tratarán con más detalle estos aspectos.

El estudio de la interacción entre campos electromagnéticos no ionizantes creados por elementos tecnológicos (tales como líneas de alta tensión, telefonía móvil, electrodomésticos, aparatos y maquinaria industrial, etc.) y los seres vivos, así como su posible influencia negativa en la salud, es una cuestión que, por su enjundia, y sobre todo por la inquietud social que, como hemos señalado, viene despertando desde la década de los ochenta (en lo que a España se refiere, ya que en EEUU ha sido tema de estudio desde la década de los sesenta), está cobrando una especial relevancia tanto en la comunidad científica como en la política.

No obstante el hecho de ser empleada la magnetoterapia en la Clínica por sus efectos beneficiosos para la salud, desde hace ya tiempo, pero especialmente en los quince últimos años, los trabajos relacionados con los potenciales efectos negativos de las radiaciones electromagnéticas de frecuencia

extremadamente baja, de microondas y de radiofrecuencia, han crecido de forma espectacular. Las ramas de la ciencia involucradas en dichos estudios comprenden un amplio espectro: la Física, Biología, Medicina, Zoología y Botánica, Geología, las Ingenierías Mecánica, Eléctrica, Electrónica y de Telecomunicaciones, se han interesado en esta materia, realizando diversas investigaciones al respecto.

Los exhaustivos estudios científicos llevados a cabo no han hallado pruebas de que unos campos de tan baja frecuencia e intensidad como los generados por las instalaciones eléctricas puedan producir efectos nocivos "a largo plazo" (es decir, enfermedades) en la salud, aunque tampoco resultaría veraz declarar lo contrario. Se debe hacer referencia a resultados inciertos y en discusión⁴ y a aquellos en los que se les ha adscrito a determinadas patologías.⁵

Así, se ha comprobado que estos campos sí pueden suponer ciertos riesgos para el organismo -bien establecidos en la actualidad-, por presentar efectos inmediatos sobre la salud. Dichos efectos comprenderían: la estimulación de nervios periféricos y músculos, shocks y quemaduras provocadas por

⁴ Como reflejan los trabajos de García Sagredo, J.M., Parada, L.A. y Monteagudo, J.L., "Effect on SCE in human chromosomes in vitro of low level pulsed magnetic fields", *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 1990: 185-188, y García Sagredo, J.M. y Monteagudo, J.L., "Effect of low level pulsed electromagnetic fields in human chromosomes in vitro: analysis of chromosomal aberrations", *Heredity*, 115, 1991: 9-11, entre otros.

⁵ Por citar aquí algún ejemplo, véase al respecto la publicación de Wertheimer, N. y Leeper, E., "Electrical wiring configurations in childhood cancer", *Am. J. Epidemiol.*, 109, 1979: 272-284, o la de Feychting, M. y Ahlbom, A., "Magnetic fields and cancer in people residing near swedish high-voltage power lines", JMM. Report 8/92 Karolinska Institut, Stockholm, Sweden, 1992; y *Am. J. Epidemiol.*, 1993: 138- 467.

contactos con objetos conductores e incrementos de temperatura de los tejidos causados por absorción de energía durante exposiciones a CEM .

Por otra parte, es necesario apuntar que la valoración de los posibles efectos de las radiaciones no ionizantes no puede hacerse eludiendo el hecho de que la identificación de una respuesta biológica no implica directamente la existencia de un efecto perjudicial para la salud. Así, los sistemas biológicos responden a estímulos externos de diversa naturaleza, y lo hacen siguiendo patrones fisiológicos de respuesta que permiten al sistema relacionarse con su medio y adaptarse a éste de forma equilibrada. Estas respuestas normales son ejemplos de efectos biológicos. Algunos de estos efectos pueden ser nocivos, pero en muchos casos las repercusiones que los efectos pudieran tener sobre la salud son irrelevantes o, simplemente, indeterminados. Por consiguiente, para aquellos agentes, físicos o químicos, capaces de provocar en humanos respuestas significativas, la consideración de peligrosos o inocuos habrá de ser determinada en función de las características específicas de la respuesta. Tales características incluyen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), la irreversibilidad del efecto, la incapacidad fisiológica del sujeto para compensar dicho efecto y una alta probabilidad de que la respuesta conduzca a efectos nocivos para el individuo.⁶

La complejidad de modelos teóricos capaces de definir claramente cuáles

⁶ World Health Organization, "Non ionising Radiation Protection", WHO Regional Publications, Regional Office for Europe, Copenhagen, European Series, 30, 1991.

son las formas en que las radiaciones a estudio interaccionan con la materia viva, así como la dificultad que entraña la explicación de procesos bioquímicos y biológicos, a niveles fundamentales, que pudieran estar relacionados con las radiaciones no ionizantes, hacen que los citados modelos sean poco fiables y que las conclusiones que de ellos se derivan deban ser consideradas, cuando menos, con precaución.

A su vez, los trabajos de campo realizados hasta la fecha en la población en general o en trabajadores de grupos de riesgo, han adolecido de falta de método (no existía una dosimetría fiable), a veces de ideas de partida preconcebidas y, en general, de una estadística epidemiológica escasa para extraer de ella conclusiones definitivas.

De esta manera, los datos epidemiológicos recogidos hasta el momento sobre efectos carcinogénicos y mutagénicos de campos electromagnéticos de 50 ó 60 Hz (ELF-CEM) proporcionan resultados contradictorios. Este tipo de estudios comenzó con Wertheimer Leeper, quien describió, en 1979, un aumento de leucemias en familias que vivían junto a conducciones eléctricas. Estos resultados no fueron refrendados posteriormente por los trabajos de Fulton y col., (1980), al no hallar éstos incremento alguno de la enfermedad en tal supuesto. Nordström y col., (1983), describen un aumento de malformaciones congénitas en hijos de trabajadores de subestaciones de alto voltaje y, a su vez, Tomenius y col (1986) hallan dos veces más tumores del SNC en personas expuestas a campos de 50 Hz que en las no expuestas. Aunque se observa cierta falta de

rigor entre los estudios realizados, en los cinco últimos años se han publicado nuevos trabajos relacionando, tanto la leucemia infantil como la del adulto, así como otros cánceres infantiles, con la exposición a CEM de 50 ó 60 Hz.⁷ Sin embargo, posteriormente, Linet y col., (1997), no consiguen demostrar relación entre la leucemia infantil y la exposición residencial a un CEM de 60 Hz; estudios del año en curso admiten un incremento moderado, aunque no estadísticamente significativo, de leucemias infantiles en casos de exposición residencial a campos de 16,7 Hz,⁸ asimismo, se admite en otros estudios la exposición ocupacional a CEM como un factor de riesgo para otros tipos de cáncer, aun sin evidencias claras de su papel etiológico en ellos.⁹

Los datos experimentales sobre inducción de daño genético también son contradictorios: por un lado estudios “in vivo” en trabajadores del ferrocarril expuestos a CEM de 50 Hz, realizados por Nordström y col. en 1981, describen un aumento de aberraciones cromosómicas, no confirmado por Bauchinger y col. en el mismo año.

⁷ Así lo describen, por ejemplo, los trabajos de Tynes, T.; Andersen, A.; Langmark, F., “Incidence of cancer in Norwegian workers potentially exposed to electromagnetic fields”, *Am. J. Epidemiol.*, 136, 1992: 81-88.; Floderus, B.; Persson, T.; Stenhund, C.; Wennberg, A.; Ost, A. y Knave, B., “Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukaemia and brain tumours. Case-control study in Sweden”, *Cancer causes Control*, 4, 1993: 465-476; Feychting, M. y Ahlbom, A., “Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines”, *Am. J. Epidemiol.*, 138, 1993: 467-481; Olsen, J.I.I.; Nielsen, A. y Schulgen, O., “Residence near high-voltage facilities and risk of cancer in children”, *Brit. Med. J.*, 307, 1993: 891-895; Verkasaalo, P.K.; Pukkal, E.; Hongisto, M.Y.; Valjus, J.E.; Jarvinen, P.J.; Heikkila, K.V. y Koskenvuo, M., “Risk of cancer in Finnish children living close to power lines”, *Brit. Med. J.*, 307, 1993: 895-899.

⁸ Schuz, J.; Grigat, J.P.; Brinkmann, K. y Michaelis, J., “Childhood acute leukaemia and residential 16.7 Hz magnetic fields in Germany”, *British J. of Cancer*, 84(5), Marzo, 2001: 697-699.

⁹ Pollan, M.; Gustavsson, P. y Floderus, B., “Breast cancer, occupation, and exposure to electromagnetic fields among Swedish men”, *Am. J. Industr. Med.*, 39(3), Marzo, 2001: 276-285.

Otros estudios “in vitro” con células humanas no encuentran alteraciones cromosómicas con CEM de 50 ó 60 Hz.¹⁰ Así, García Sagredo y col., en 1990, no describen modificaciones en el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos “in vitro”, bajo la acción de un CEM pulsado de baja frecuencia -similar al utilizado en la terapia traumatológica-, aunque sí encuentran, posteriormente, con el mismo CEM y en las mismas condiciones experimentales, un aumento significativo de aberraciones cromosómicas inducidas en linfocitos humanos.¹¹

Una revisión realizada por McCann y col. en 1993, refiere más de setenta trabajos experimentales con resultados diversos. Lo que se puede deducir de esta revisión, así como de la literatura científica disponible, es la dificultad de establecer conclusiones definitivas y fiables de la comparación entre los trabajos existentes, debido a los dispares ensayos, metodologías, células y organismos de experimentación utilizados.

Un factor que tiende a oscurecer la racionalidad que debería ser la base de todo trabajo científico, es la implicación en este campo de grandes intereses particulares, especialmente de compañías eléctricas y de comunicación, que

¹⁰ Sirvan para ilustrar el caso, entre otros muchos, los trabajos de Nordenson, I.; Hansson-Mild, K.; Nordström, S.; Sweins, A. y Birke, E., “Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electric fields: In vivo and in vitro studies”, *Radiat. Environ. Biophys.*, 23, 1984: 191-201; Cohen, M.M.; Kunska, A.; Astemborski, J.A.; McCulloch, D. y Paskewitz, D.A., “Effect of low-level, 60Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells: I. Mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes”, *Bioelectromagnetics*, 7, 1991: 415-423; Khalil, A.M. y Qassem, W., “Cytogenetic effect of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics”, *Mutat. Res.*, 247, 1991: 141-146.

¹¹ García Sagredo, J.M. y Monteagudo, J.L., “Effect of low-level ...”, op. cit., 9-11.

encargan por su cuenta trabajos para intentar contrarrestar aquellos que perjudican sus intereses económicos.

Teniendo en cuenta esta carencia de información fehaciente sobre el tema, y reconociendo que existe la necesidad de establecer unos criterios adecuados de seguridad ante exposiciones a radiaciones no ionizantes en ambientes ocupacionales y residenciales, las autoridades sanitarias nacionales e internacionales han optado por formar comités de expertos encargados de estudiar el problema. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) encargó a la *International Commission on Non- Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP), la elaboración de un conjunto de normas consensuadas para la protección de los ciudadanos ante RNI.

A pesar de esta política de precaución, que ha llevado a los expertos a revisar de manera exhaustiva la literatura científica existente según una “evaluación de la credibilidad de los datos publicados”, tan solo se han tenido en cuenta aquellos efectos que los expertos calificaron como “bien establecidos”, quedando aún grandes vacíos en la investigación. Se justifica, por tanto, la necesidad de profundizar en el estudio de la materia, así como la apertura de nuevas líneas de experimentación, con metodologías adecuadas, modelos teóricos más exactos y datos experimentales fiables y libres de contaminación, al objeto de que se adopten, en caso de ser necesario, las adecuadas medidas de protección y seguridad.

I.3.- OBJETIVOS

- Determinar los efectos de un campo magnético de 50 Hz en la proliferación celular de cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica sometidos a distintas intensidades de campo (32, 64 y 96 G que corresponden a 3,2, 6,4 y 9,6 mT, respectivamente).
- Establecer, si es que existe, daño genético en linfocitos sometidos a un campo magnético de 50 Hz y a las intensidades de campo descritas en el punto anterior.
- Investigar la potenciación del efecto tóxico ocasionado por incubación con sobrecarga de plomo y hierro en linfocitos, en presencia de un campo magnético de 50 Hz en cuanto a daño genético y proliferación celular se refiere. Establecer posibles sinergismos entre estos metales y la radiación de frecuencia extremadamente baja a las intensidades de campo establecidas.
- Estudiar la posible variación de distintos parámetros enzimáticos y bioquímicos de sangre humana sometida a la acción de un campo magnético de 50 Hz a distintos tiempos de exposición y a las intensidades de campo de 1,6, 3,2 y 6,4 mT.
- Comprobar, *in vivo*, el efecto que un campo magnético de frecuencia extremadamente baja puede ejercer en la permeabilidad de la barrera

hematoencefálica de ratones sometidos a una radiación de 50 Hz y 27,5 Oe (2,75 mT).

- Definir las propiedades eléctricas (conductividad y permitividad) de distintos tejidos de ratas tratadas con dosis tóxicas de hierro y plomo mediante irradiación con campos magnéticos de radiofrecuencia 2,45 GHz.
- Establecer una relación entre los parámetros sanguíneos de los animales estudiados, la cantidad de metal presente en los órganos evaluados y las variaciones observadas en la permitividad y conductividad de sus diferentes tejidos, según el tratamiento aplicado a cada grupo.

I.4.- PLAN DE TRABAJO

Aunque la mayor parte de los expertos, comisionados por agencias de ámbito nacional e internacional, coinciden en sus conclusiones con las publicadas por la ICNIRP que tiene en cuenta, al establecer las restricciones, exclusivamente los efectos térmicos, algunos autores discrepan al respecto, fundamentándose en el bloque limitado de evidencia experimental, tanto *in vitro* como *in vivo*, que muestra indicios de respuesta biológica por debajo de los niveles propuestos por la ICNIRP-CUE. A partir de estos indicios, estos investigadores consideran que, aunque no bien definidos todavía, existen otros mecanismos de respuesta biofísica a las RNI que no han sido contemplados en las directrices y recomendaciones aprobadas.

En base a estas discrepancias, y a fin de obtener datos capaces de corroborar una u otra postura, hemos optado en nuestro trabajo, en primer lugar, por intentar establecer los posibles efectos, sobre cultivos de células humanas, de un campo magnético de frecuencia extremadamente baja (50 Hz), al ser ésta la frecuencia de los campos electromagnéticos generados por las líneas de alta tensión de la red eléctrica, a las que se imputan diversas afecciones.

A lo largo de la presente exposición nos referiremos con el término *campo magnético* al aplicado en nuestros experimentos, aunque lo exacto sería nombrarlo como *campo magnético oscilante*, ya que se trata de un campo magnético que oscila con una frecuencia de 50 ciclos por segundo (50 Hz).

La elección del cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica como sujeto del estudio obedece al hecho de que la mayor parte de los estudios epidemiológicos relacionados con las bajas frecuencias reflejan casos de leucemia,¹² principalmente en niños (a pesar de que otros trabajos dejan esta hipótesis en entredicho, como se ha señalado con anterioridad).¹³

De cualquier manera el hecho a tener en cuenta es que, en diversos

¹² Ahlbom, A., "Residential epidemiological studies", en: Matthes, R., Bernhardt, J.H. y Repacholi, M.H., eds. *Biological effects of static and ELF electric magnetic fields*, Oberschleissheim, Germany: ICNIRP Publication 4/97, 1997: 185-190; Saffer, J.D. y Thurston, S.J., "Cancer risk and electromagnetic fields", *Nature*, 375, 1995: 22-23; Sancho, M. y López, E., "Campos electromagnéticos y salud", *Rev. Esp. Fisiol.*, 9, 1995: 21; Savitz, D.A.; Wachtel, H.; Barnes, F.A.; John, E.M. y Tvrdek, J.G., "Case control study of childhood cancer and exposure to 60 Hz magnetic fields", *Am. J. Epidemiol.*, 128, 1988: 21-38.

¹³ Bennet, W.R. "Cancer and power lines", *Phys. Today*, Abril, 1994: 23-29; Kolodynski, A.A. y Kolodynska, V.V., "Motor and psychological functions of school children living in the area of the Skrunda radio locations station in Latvia", *Sci. Total Environ.*, 180, 1996: 87-91.

estudios epidemiológicos se han postulado, como secuela de la exposición a campos electromagnéticos, algunos casos de leucemia infantil así como de leucemia linfocítica crónica en adultos que han trabajado en el mantenimiento de líneas de alta tensión;¹⁴ por ello hemos juzgado la opción de experimentar con linfocitos humanos como la más idónea, al tratarse, además, de células muy sensibles al daño genético.

Por otra parte se pretende comprobar *in vitro* la hipótesis de un posible sinergismo en el efecto combinado de este tipo de campos magnéticos con altas concentraciones de metales pesados, siguiendo las sugerencias del Parlamento Europeo, que aconseja un programa específico de investigación experimental sobre el efecto de los campos magnéticos en la salud humana, marcando en él la pauta de estudiar la conjunción del efecto químico de contaminantes ambientales con el de los campos magnéticos,¹⁵ es decir, el sinergismo que puede darse en el cuerpo humano entre el efecto de campos magnéticos y xenobióticos (compuestos químicos que contaminan el medio ambiente, aguas y alimentos).¹⁶

Diversos iones metálicos y alguno de sus compuestos han revelado ser carcinógenos en humanos y animales de experimentación;¹⁷ entre ellos se

¹⁴ Guénel, P.; Raskmark, R., Anderson, J.B. y Lynge, E., "Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark", Brit. J. Industr. Med., 50, 1993: 758-764.

¹⁵ D.O.C.E., Nº C 205/440, Documento Nº A3-0238/94 de 5 de Mayo de 1994.

¹⁶ Un estudio del año en curso describe, por ejemplo, sinergismo en la exposición de trabajadores a un CEM y aceite mineral (Skyberg, K.; Hansteen, I.L. y Vistnes, A.I., "Chromosomal aberrations in lymphocytes of employees in transformer and generator production exposed to electromagnetic fields and mineral oil", *Bioelectromagnetics*, 22(3), Abril, 2001: d150-160.

¹⁷ IARC. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, World Health Organization, Suppl. 7, 56, 1987.

encuentra el plomo, elegido para nuestro estudio por aparecer en el organismo a causa de la contaminación, tanto ambiental como de los alimentos; asimismo se incluye en el estudio el hierro, presente en los seres vivos de forma natural pero que, por sus características paramagnéticas, podría verse alterado por las radiaciones a estudio.

Hay que tener en cuenta que los campos magnéticos presentes en el ambiente actúan sobre las cargas eléctricas de los organismos expuestos, dando lugar, al igual que en los sistemas inertes, a corrientes y campos eléctricos dentro de los mismos. En exposiciones a frecuencias extremadamente bajas, el campo eléctrico interno es cerca de 10^6 veces más pequeño que el campo exterior al organismo.

La relación del campo eléctrico en el aire al campo eléctrico en el interior del tejido se puede aproximar por:
$$\frac{E_{\text{interior}}}{E_{\text{aire}}} = \frac{w \cdot \epsilon_0}{\sigma_{\text{interior}}} = 0,7 \cdot 10^{-8}$$
 Donde σ_{interior} = conductividad del campo (un electrolito) de valor 0,5 s/m; ϵ_0 =permitividad eléctrica, y w =frecuencia angular. La ley de Faraday establece que se induce una fuerza electromotriz, en un circuito cerrado, debido al flujo magnético variable que lo atraviesa. Si el flujo magnético es $\phi \cdot r^2 \cdot B$, y $B = B_0 \cdot \text{sen} \cdot w \cdot t$, entonces $E_{\text{interior}} = -\frac{1}{2} r \cdot B \cdot w$, expresado en v/m, (campo inducido). La densidad de corriente es $j = \sigma \cdot E$, siendo la corriente total $I = \sigma \cdot A \cdot E$, donde A =área. Por eso el campo externo induce una E_{interior} que da lugar a una densidad de corriente j ; de esta manera, por cada kV/m de campo exterior se induce en el cuerpo una corriente proporcional al área de la superficie del cuerpo, lo que para un individuo adulto supondría, a una frecuencia de 50 Hz y a 1 mT de campo

magnético horizontal, unos 4 mA/m². La densidad de corriente, que depende de la conductividad del tejido de que se trate, oscila entre los 80 mA/m² en cabeza y los 250 mA/m² en tronco.

Cabe destacar, además, que en la mitocondria de mamíferos tiene lugar la cadena de transporte electrónico desde el NADH (potencial redox de -325 mV) al oxígeno molecular (de +825 mV); el movimiento electrónico que ello implica genera un campo magnético cuyas consecuencias y patología no han sido estudiadas y que, presumiblemente, presentará interacciones con los campos magnéticos exteriores. La gran mayoría de proteínas y citocromos implicados en esta cadena contienen el ión hierro en su estructura molecular, el elemento de mayor afinidad magnética conocido. La producción de energía (tres moléculas de ATP por una de NADH), induce a pensar que los campos magnéticos externos podrían, de alguna manera, interaccionar con la producción de energía y la patología genética de las numerosas metaloproteínas que cuentan con el ión hierro en su grupo prostético.

En una segunda fase de estudio, se han realizado varios experimentos con objeto de estudiar *in vivo* las posibles secuelas de una exposición prolongada a campos magnéticos de muy baja frecuencia en el sistema nervioso, en base a distintos estudios que postulan que la exposición a campos de radiofrecuencia de baja intensidad, insuficiente para producir calentamiento, puede, no obstante, alterar la actividad eléctrica del cerebro en gatos y conejos al modificar la movilidad de los iones calcio. Este efecto se ha constatado asimismo en tejidos y

células aislados.¹⁸

En nuestro trabajo hemos estudiado las variaciones de permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratones sometidos, durante una semana, a la acción de radiaciones electromagnéticas de frecuencia extremadamente baja.

Por último, señalar que el estudio de los efectos biológicos de los campos electromagnéticos debe ser multidisciplinar; para ello se necesitan opiniones y conocimientos de diversos grupos de investigación con el objetivo de establecer, con criterio claro y fiable, unos límites dosimétricos seguros. Creemos que en este asunto es imprescindible la colaboración entre especialistas en Medicina, Bioquímica y Física, por la falta de claridad inicial y la diversidad de facetas que la materia implica. No sólo concurren en ella numerosos parámetros biológicos que afectan al metabolismo y a otros factores bioquímicos poco conocidos, sino también parámetros físicos, entre los que destacan las propiedades eléctricas (conductividad y permitividad) de los tejidos. Conscientes de esta necesidad de cooperación, y en colaboración con la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Complutense de Madrid, hemos estudiado la variación de las propiedades eléctricas de tejidos de ratas tratadas con los metales que nos ocupan, mediante irradiación con campos de radiofrecuencia.

¹⁸ Así lo hacen, por ejemplo, los trabajos de Neubauer, C.; Phelan, A.M.; Kues, H. y Lange, D.G., "Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex", *Bioelectromagnetics*, 11(4), 1990: 261-268, o los de Salford, L.G.; Brun, A.; Stureson, K.; Eberhardt, J.L. y Persson, B.R., "Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz", *Microsc. Res. Tech.*, 27(6), Abril, 1994: 535-542), sobre ratas expuestas a RF de 915 MHz – 2,45 GHz; que describen un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a SAR 0,016 W/Kg y superiores.

II.- ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

II.1.- CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS. GENERALIDADES.

II.1.1.- El electromagnetismo: visión histórica

La acción atractiva de la magnetita o imán natural sobre el hierro era conocida desde la antigüedad; así Plinio y Aristóteles señalaron la posibilidad de imanar temporalmente el hierro dulce por influencia del imán natural. La aplicación a la navegación de este fenómeno se realizó hacia los siglos XI y XII, y fue desarrollándose progresivamente: en sus primeros viajes a través del Atlántico, Colón señaló las variaciones de la *declinación magnética*, concepto que se desarrolló paralelamente al de la *inclinación magnética*, que Hartman y Norman descubrieron desplazando una aguja imanada que giraba alrededor de un eje horizontal. Peregrinus de Maricourt y William Gilbert desarrollaron las primeras teorías sobre el magnetismo al estudiar las variaciones en la orientación de la aguja magnética y, a su vez, Coulomb estableció las leyes de acción de las cargas eléctricas en función de la distancia, aplicando al magnetismo diversos resultados teóricos obtenidos en electrostática.

En el s. XIX, Poisson inició la teoría de los campos magnéticos, y Humboldt, Gauss y Mascart establecieron la teoría clásica del magnetismo

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

terrestre.¹⁹ En 1819, Oersted descubrió la interdependencia entre electricidad y magnetismo; la ley de Ampère (1829), relacionó el campo magnético de un conductor con la corriente que lo atraviesa. En 1855, Faraday descubrió la inducción magnética, y en 1873, Maxwell estableció las ecuaciones del campo electromagnético y sentó la teoría electromagnética de la luz.

La investigación de las propiedades magnéticas de la materia culminó con la distinción efectuada por Pierre Curie, en 1895, entre paramagnetismo y diamagnetismo; al mismo tiempo señaló la transición entre estos dos estados por efecto de una elevación de temperatura. Paul Langevin formuló la teoría atómica del diamagnetismo y paramagnetismo a principios del siglo actual.

La existencia de propiedades magnéticas en una sustancia puede demostrarse colocándola entre los polos de un campo magnético intenso; si se trata de hierro o de una sustancia *ferromagnética* será atraída hacia la región en la que el campo es más intenso; pero asimismo, cualquier sustancia será siempre influida por el campo, aunque en un grado extraordinariamente pequeño comparado con el caso del hierro. Mientras unas sustancias tienden a dirigirse hacia la región de intensidad máxima del campo, otras se dirigen hacia la región en que el campo es más débil: las primeras se denominan sustancias

¹⁹ La Tierra se comporta en conjunto como un inmenso imán cuyos polos se hallan situados en las proximidades de los polos geográficos, sin coincidir con ellos. Las causas de este fenómeno no son conocidas, aunque se supone debido a la acción de corrientes eléctricas superficiales producidas por efecto termoeléctrico. El campo debido al magnetismo terrestre es bastante regular, y para su estudio se supone dividido en dos componentes: el *vertical* y el *horizontal*, cuya posición define la *declinación* y la *inclinación* magnéticas. El valor del campo magnético terrestre oscila entre los 0,3 y los 0,7 Gauss.

paramagnéticas, y las segundas *diamagnéticas*, y todas las sustancias, incluso los líquidos y los gases, quedan incluidas dentro de uno de estos grupos. Es decir, las sustancias ferromagnéticas pueden adquirir una imanación inducida muy considerable, siempre en el sentido del campo inductor; las sustancias paramagnéticas y diamagnéticas reciben una imanación inducida muy pequeña, que tiene, respectivamente, el mismo sentido o sentido contrario al del campo inductor. A escala microscópica, esta desigualdad en el comportamiento magnético se explica en función de las interacciones electrónicas y de la ordenación del espín electrónico, ya que los fenómenos magnéticos, como actualmente se sabe, proceden de las fuerzas originadas por las cargas eléctricas en movimiento; la presencia de éstas da origen al campo magnético, cuyo comportamiento es descrito por las leyes de Maxwell. Las propiedades magnéticas de la materia tienen su origen en los momentos magnéticos totales de sus átomos, debidos simultáneamente al movimiento de los electrones en torno al núcleo y al espín de éstos.

II.1.2.- El espectro de la radiación electromagnética: radiaciones ionizantes y no ionizantes.

Las radiaciones electromagnéticas son aquellas que no implican el desplazamiento de ninguna masa, ya que lo que transportan son fotones. Se trata de fenómenos ondulatorios, y todos ellos obedecen las mismas leyes físicas, pudiendo describirse en función de dos parámetros: longitud de onda (λ) y frecuencia (ν). Cuanto menor es la longitud de onda, mayor es la frecuencia, y

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

con ella, la energía de la radiación. La emisión de un tipo u otro de onda depende de la frecuencia de oscilación del emisor.

La *frecuencia* de una onda se define como el número de veces por segundo que la onda oscila alrededor del valor de la posición de equilibrio, y su unidad es el ciclo /segundo, conocida con el nombre de hertzio (Hz). El valor inverso de la frecuencia representa el denominado *periodo* (T), que indica el tiempo necesario para la realización de un ciclo completo y se mide en segundos. La *longitud de onda* viene dada por la distancia entre puntos análogos en dos ondas sucesivas, y se expresa en metros.

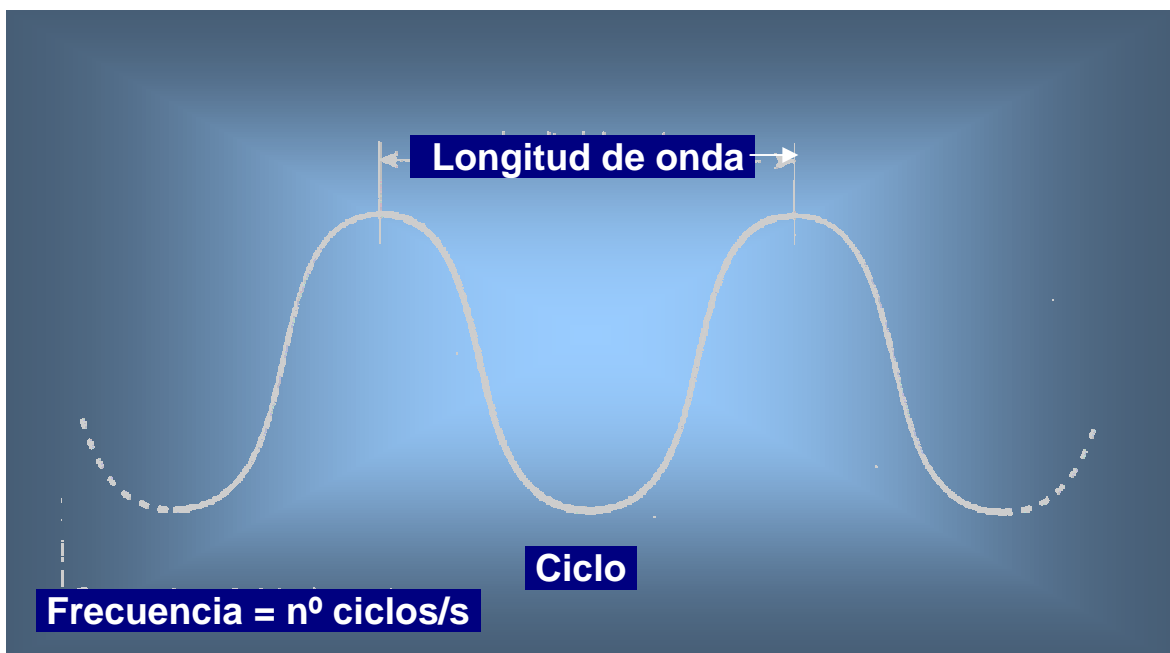


Fig.1: Representación esquemática de una onda y sus parámetros

Los seres vivos, a lo largo de su desarrollo, se encuentran sometidos a la acción de radiaciones electromagnéticas provenientes de emisores naturales. Así

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

ocurre con los rayos infrarrojos y ultravioletas que emite el sol, o con el campo magnético terrestre. También de origen natural son los rayos X y gamma provenientes del espacio; incluso la propia luz visible que percibimos no es más que una onda electromagnética.

Todos estos campos y radiaciones forman parte del **espectro electromagnético**, y presentan características físicas comunes. La principal diferencia entre ellas, como hemos dicho, es su longitud de onda y su frecuencia, que determinan tanto la energía que transmiten como los efectos biológicos que pueden producir en los organismos.

Las radiaciones electromagnéticas pueden clasificarse, de mayor a menor energía, en tres grandes grupos: radiaciones ionizantes, radiaciones ópticas y campos electromagnéticos. Cada una de estas zonas del espectro, se divide a su vez en otras menores, como se puede observar en la tabla 1.

Radiación ionizante			Radiación óptica			Campos electromagnéticos		
Rayos Cósmicos	Rayos γ	Rayos X	Ultra violeta	Visible	Infrarrojo	RF		Por debajo de la RF
						Micro-ondas	Radio-frecuencia	

Tabla 1: Clasificación del espectro electromagnético en zonas.

Es costumbre describir las radiaciones ionizantes por su energía, las radiaciones ópticas por su longitud de onda y los campos electromagnéticos por

su frecuencia, a pesar de que todas las radiaciones pueden definirse por cualquiera de estas tres características.²⁰

En la figura 2 se representa un esquema del espectro electromagnético en el que aparecen, de abajo hacia arriba, en frecuencias crecientes, las distintas zonas en que éste se divide. Por supuesto, en las zonas de transición la ubicación en una región u otra es ambigua, existiendo tramos donde los distintos tipos de radiación se solapan; este es el caso, por ejemplo, de las radiaciones más energéticas del ultravioleta, que se encuentran en la zona ionizante del espectro.

II.1.2. a.- *Radiaciones ionizantes.*

La energía que transmite una onda electromagnética depende linealmente de su frecuencia. Si la relación frecuencia/energía es lo suficientemente elevada, la onda puede afectar al material genético de las células, produciendo mutaciones e iniciando así un posible proceso cancerígeno. Éste es el caso de los rayos X o gamma, conocidos agentes cancerígenos, cuya frecuencia es superior a 10^{16} Hz; a esta región del espectro electromagnético se la conoce como ***radiación ionizante***.

²⁰ La energía puede medirse en varias unidades, pero la unidad habitual para las radiaciones ionizantes es el electrón- voltio (eV); la longitud de onda se suele medir en nanómetros (nm) o en micras (μm); y, finalmente, para medir la frecuencia de una radiación se utilizan los hercios (Hz).

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

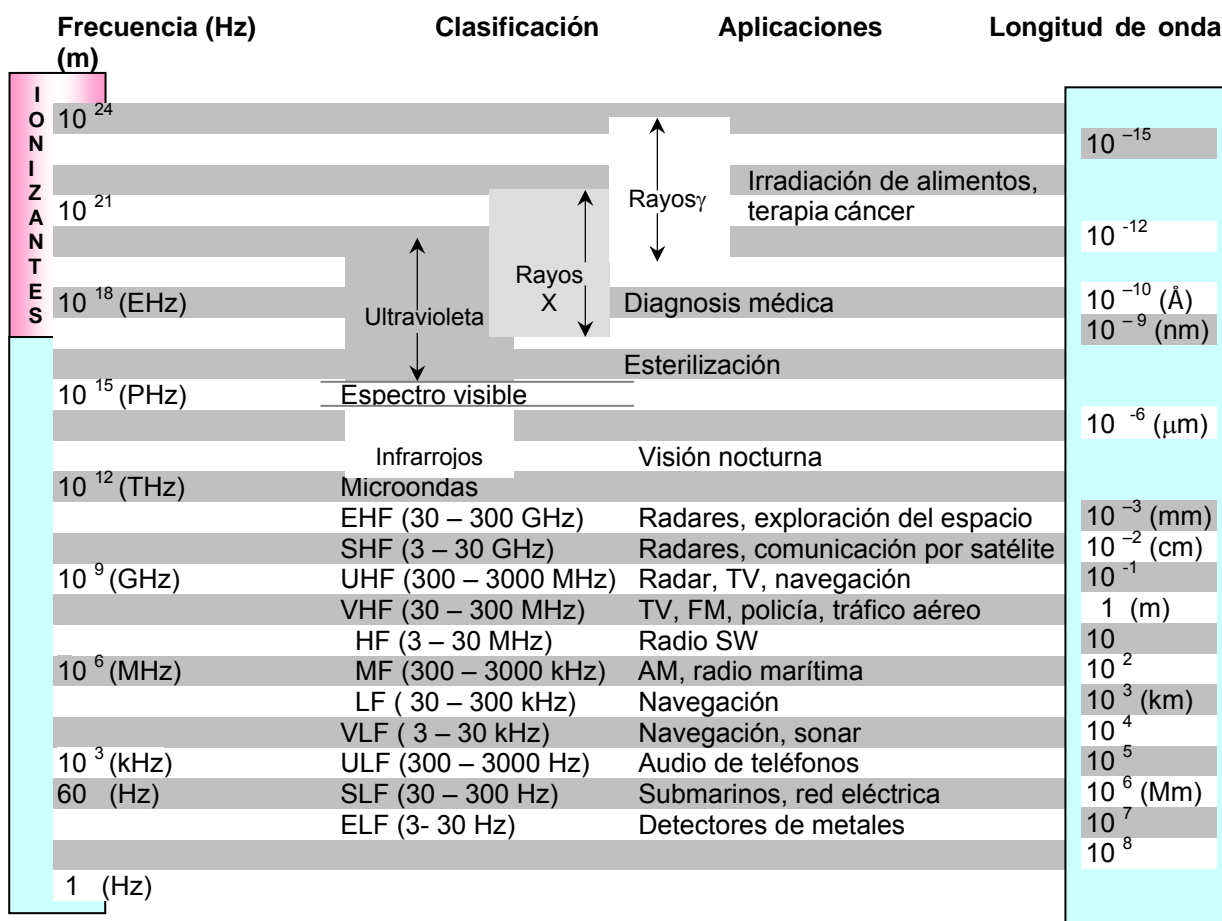


Fig.2: Espectro de la radiación electromagnética.
(Longitud de onda de la visión humana: 720 nm- 380 nm).

Dado que la energía necesaria para arrancar un electrón de un átomo de oxígeno es del orden de 10-12 electrón- voltios (eV), puede considerarse como radiación ionizante toda aquella cuya energía sea superior a 10 eV, cuya frecuencia esté por encima de los 10^{16} Hz, o cuya longitud de onda sea inferior a unos 10 nm.

Las radiaciones ionizantes tienen, pues, suficiente energía como para arrancar electrones de los átomos, convirtiéndolos en iones y provocando de esta forma reacciones químicas capaces de afectar a algunas moléculas complejas de gran importancia para la vida; de ahí su peligrosidad.

II.1.2. b.- Radiaciones no ionizantes. Efectos biológicos.

A las radiaciones cuyas frecuencias van desde unas decenas de hercios hasta el límite ionizante, se las denomina en general **radiaciones no ionizantes**, y comprenden dos regiones difusas: la de las radiaciones ópticas (excepto la zona más alta del rango ultravioleta, como ya se ha indicado) y la de los campos electromagnéticos.

La energía que portan las ondas no ionizantes se cede a los átomos y moléculas de dos formas principales: aumentando su vibración²¹ y cambiando su rotación.²² Estos cambios vibracionales y rotacionales implican un aumento de la energía cinética de los átomos y moléculas del medio que se pierde en forma de calor, provocando un aumento local de la temperatura.

²¹ Cuando una molécula está formada por dos átomos, estos pueden vibrar, acercándose y alejándose, entre dos distancias límite; en estas dos posiciones, la velocidad de las masas es nula y toda la energía se halla acumulada como energía potencial elástica; en cambio, cuando pasan por la posición de equilibrio, toda la energía del sistema es cinética. La energía total del sistema se mantiene, sin embargo, constante, cambiando únicamente si varían la frecuencia o amplitud de la vibración.

²² En este caso, la energía absorbida queda acumulada en la molécula como energía cinética de rotación, aumentando la velocidad angular que la molécula pudiera poseer previamente. La materia puede absorber energía por esta vía sólo cuando se encuentra en estado gaseoso y sus moléculas son poli atómicas, pues en estado sólido o líquido éstas no tienen libertad suficiente para estar animadas de movimientos rotatorios.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Este es el principal y más conocido efecto de las radiaciones no ionizantes sobre la materia, la cesión de calor a la misma, fenómeno conocido como *efecto térmico*. Por el contrario, se han detectado efectos sobre materia viva en los que la componente térmica no parece relevante, por lo que estos hipotéticos efectos son denominados *efectos no térmicos*.

- **Efectos térmicos:** los efectos térmicos de las radiaciones no ionizantes se traducen en cambios locales de la temperatura corporal.²³ Este incremento de la temperatura no es uniforme en todo el cuerpo sometido a la irradiación, sino que se crea un cierto gradiente de temperatura en determinadas zonas del mismo. La falta de uniformidad en el reparto del calor cedido al cuerpo es imputable al diferente contenido en agua de los tejidos, que por ello poseen una distinta capacidad calorífica. Por otra parte, los posibles daños térmicos sobre los órganos de un ser vivo dependen de la facilidad de dichos órganos para disipar el calor acumulado. Esto se traduce, en mamíferos, en que los órganos con una vascularización pobre sufrirán más daño, con una misma cantidad de radiación, que los órganos

²³ La exposición a densidades de campo de 1- 10 mW/cm² puede producir un importante aumento de temperatura del tejido, aunque no siempre un daño estructural; este efecto ha sido ampliamente descrito en algunos informes ("Electromagnetic fields and the risk of cancer. Report of an advisory group on non-ionising radiation", Documents of the NRPB 3, (1), 1992: 138; "Electromagnetic fields 300 Hz- 300 GHz", Environmental Health Criteria, 137, UNEP/WHO/IRPA, Ginebra, 1993; "Health issues related to the use of hand held radiotelephones and base transmitter", *Health Phys*, 70: 587- 593, ICNIRP 1996; "Public health and safety at work, non- ionising radiation sources, exposure and health effects", en: Mckinlay,. Directorate General V, Employment, Public Relations and Social Affairs, Luxembourg, European Commission, EC 1996a; "Possible health effects related to the use of radiotelephones. Proposal for research programme by European Commission Expert Group", Directorate General XIII, Telecommunications Information Market and Exploitation of Research, Brussels, European Commission, EC, 1996b).

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

más vascularizados. Así, por ejemplo, serán más sensibles a las radiaciones los ojos o los testículos, que la piel, altamente vascularizada debido a su principal función en el mantenimiento de la homeotermia.²⁴ En caso de que el calor que cede la onda no ionizante al organismo supere unos niveles que éste no pueda contrarrestar con sus mecanismos reguladores, los tejidos resultarán dañados. Dichos daños pueden ir desde quemaduras de distinta consideración, hasta la muerte del tejido.

En otro orden de cosas, parece ser que para que haya posibilidad de cesión de energía a un ser vivo, el tamaño de éste debe estar en cierta relación con la longitud de onda de la fuente de radiación. Así, las estimaciones indican que el tamaño debe ser, como mínimo, diez veces menor que la longitud de onda de la radiación en cuestión. Este hecho impone unas limitaciones a las radiaciones que pueden producir efectos térmicos en los seres humanos, ya que su longitud de onda debe tener, como máximo, veinte metros. Es decir, únicamente las ondas electromagnéticas con frecuencias superiores a los 15 MHz son capaces de ocasionar daños de origen térmico en el Hombre. Como ya hemos indicado, estas ondas son las de frecuencias superiores a las de las radiofrecuencias altas, especialmente las microondas.

²⁴ Trabajos en laboratorio han mostrado que breves exposiciones (de unos 30 minutos) a altos niveles de radiación RF (100- 200 mW/cm²) pueden causar cataratas en conejos, así como esterilidad temporal debida a cambios en la motilidad del esperma (FCC 1999).

- **Efectos de tipo no térmico:** los efectos de tipo no térmico de la radiación no ionizante con la materia son de mucho más difícil estudio y caracterización que los de origen térmico. Su etiología y patogenia no están bien descritas, cabiendo la posibilidad de que se confundan los efectos electromagnéticos sobre los seres vivos con los causados por otros agentes patógenos. No obstante, las numerosas investigaciones realizadas parecen apuntar a la existencia de determinados efectos relacionados con este tipo de radiaciones, como son:
 - a) Interacciones a nivel molecular, celular y tisular.²⁵
 - b) Interacción con órganos que presentan actividad electromagnética, como el cerebro, alterando los encefalogramas.²⁶
 - c) Posibles alteraciones genéticas.
 - d) Alteración de la conducta.

Resulta necesario, sin embargo, insistir en la dificultad que entraña la tarea de separar los efectos térmicos de los que no tienen ese origen. Por ejemplo, por calentamiento local en una glándula, la misión de ésta puede

²⁵ Sirva a modo de ejemplo, uno de los más recientes, el estudio de Neumann, E., "Disgression on chemical electromagnetic field effects in membrane signal transduction. Cooperativity paradigm of the acetylcholine receptor", *Bioelectrochem.*, 52(1), Septiembre, 2000: 43-49.

²⁶ Así se describe en numerosos estudios como los de Chizhenkova, R.A. y Safroskina, A.A., "Electrical reactions of brain to microwave irradiation", *Electro- Magnetobiology*, 15, 1996: 253-258; Pu, J.S; Chen, J.; Yang, Y.H. y Bai, Y.Q., "The effects of 3000 MHz microwave irradiation on electroencephalic energy and energy metabolism in mouse brain". *Electro- Magnetobiology*, 16, 1997: 243-247, y Vorobyov, V.V.; Galchenko, A.A.; Kukushkin, N.L. y Akoev, I.G., "Effects of weak microwave fields amplitude modulated at ELF on EEG of symmetric brain areas in rats", *Bioelectromagnetics*, 18, 1997: 293-298.

alterarse y sus efectos hacerse patentes en otra zona del organismo alejada y no alterada en su temperatura.

II.1.3.- Campos electromagnéticos: aspectos generales. Unidades.

Principios de acción biofísica

Se denomina ***campo*** a la zona del espacio donde se manifiestan fuerzas. Por ejemplo, el campo gravitatorio es la zona donde se manifiestan fuerzas gravitatorias, que son las que hacen que tengamos un determinado peso. La fuerza que ejerce un campo en las partículas que están en su interior se conoce como su ***intensidad***.

Al igual que la masa de las partículas genera un campo gravitatorio, las cargas eléctricas y su movimiento crean campos eléctricos y magnéticos, es decir, zonas donde se manifiestan fuerzas eléctricas y magnéticas. El campo eléctrico se mide en kilovoltios por metro (***kV/m***) y el campo magnético se suele medir en microteslas (***μT***), aunque en algunos países se utilizan otras unidades, como el Gauss (***G***), aspecto éste que más adelante se comentará con detalle.

Los campos electromagnéticos son los situados en la zona del espectro electromagnético correspondiente a las radiaciones no ionizantes, y que se incluyen en el grupo de las radiaciones de frecuencia inferior a 300 GHz y longitud de onda superior a un milímetro; comprenden, como se ha señalado

anteriormente, los de muy baja frecuencia, los de radiofrecuencia y las microondas.

Estos campos se dan de forma natural en el entorno, por lo que nuestro organismo está habituado a convivir con ellos a lo largo de la vida. Por ejemplo, en la Tierra existe un campo eléctrico natural producido por la diferencia de tensión entre la atmósfera y el suelo; normalmente su intensidad es de unos 0,15 kV/m, aunque puede llegar a los 20 kV/m durante las tormentas. A su vez, el movimiento de materiales magnéticos en el interior de la corteza terrestre crea un campo magnético natural que, entre otras cosas, es el responsable de que la brújula apunte siempre al norte; su valor oscila dependiendo de la posición en el globo terráqueo, entre 20 y 80 μT , con una media de 50 μT , y se sitúa alrededor de 40 μT en España.

Muchos de los estudios teóricos desarrollados durante las últimas décadas han tenido como objeto la explicación de cómo las cargas presentes en el material biológico de distintos sistemas interactúan con los CEM.²⁷ Tanto la aproximación desde la física clásica como desde la cuántica han sido utilizadas para explicar los mecanismos de acción de estas radiaciones a nivel microscópico.²⁸

²⁷ Véase, por ejemplo, el estudio de Chiabrera, A. et al., "Recent advances in biophysical modelling of radio frequency electromagnetic field interactions with living systems", en: *Proceedings of the wireless Technology Research. State of the science colloquium*, Roma, Noviembre, 1995: 13-15.

²⁸ Bernardt, J.H. y Vogel, E., "Biophysical interactions mechanisms", en: *Matthes. Non ionising Radiation. Proceedings of the 3 workshop*, Baden, Austria, ICNIRP, 22-26 Abril, 1996: 239-244.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

La interacción de campos eléctricos variables en el tiempo con los tejidos biológicos, que presentan asimismo una diferencia de carga eléctrica a ambos lados de la membrana celular, da lugar a la formación de dipolos eléctricos (polarización) y a la reorientación de los dipolos ya existentes en la membrana. Las magnitudes relativas de estos efectos dependen de las propiedades de la estructura sobre la que incide el campo, como son la conductividad y permitividad.²⁹

Los CEM inducen momentos en las moléculas y, en consecuencia, desplazamiento de iones desde posiciones estables, vibraciones entre las capas y rotación y reorientación de moléculas dipolares como el agua.³⁰ Estos mecanismos, que pueden ser descritos mediante la electrodinámica clásica, no producen efectos observables con los medios de que se dispone en la actualidad, ya que se encuentran con un medio desestabilizado por la agitación térmica; otro problema lo constituye el hecho de que la respuesta del sistema ante la radiación debe ser rápida, lo que dificulta aún más la medición. Ambas consideraciones implican la posibilidad de que exista un umbral bajo el cual respuestas aún no observables están teniendo lugar. Este umbral está presente incluso en los más sofisticados modelos si se tiene en cuenta el ruido térmico y la dinámica del sistema, luego resulta razonable pensar que lo mismo ocurre en el caso que nos ocupa.

²⁹ ICNIRP, "Guidelines for limiting Exposure to Time- varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields (Up to 300 GHz)", *Health Physics*, 74, 1998: 494-520.

³⁰ Schwan, H.P., "Biological effects of non- ionising radiation: Cellular Properties and Interactions", *Ann. Biomed. Eng.*, 16, 1988: 245-263.

Otro aspecto de los modelos biológicos de interacción es el que se dirige a una mejor comprensión de la interacción de las ondas de radiofrecuencia a nivel molecular y celular; nos referimos a la simulación dinámica molecular. Esta aproximación permite construir modelos detallados de los receptores de superficie celular, responsables de iniciar los mecanismos que alteran el metabolismo y los estados proliferativos de las células vivas.³¹

Desde el punto de vista médico no existen, de momento, razones científicas suficientes como para considerar peligrosos en biomedicina los campos electromagnéticos llamados de muy baja frecuencia (ELF-MF o extremely low frequency magnetic fields),³² emitidos por líneas de alta tensión y aparatos electrodomésticos. Por otra parte, las emisiones de radiofrecuencia (RF), escasamente conocidas por poco estudiadas, tampoco han demostrado hasta ahora tener efectos adversos claros, como ya se ha indicado, a pesar de existir indicios de ciertos efectos biológicos.

³¹ Blundell, T.L., "Structure- based drug design", *Nature*, 384 (Supl. 7), 1996: 23-26.

³² Griffin, G.D.; Khalaf, W.; Hayden, K.E.; Miller, E.J. y Dowray, V.R.; Creekmore, A.L.; Carruthers, C.W.; Williams, M.W. y Gailey, P.C., "Power frequency magnetic field exposure and GAP junctional communication in Clone 9 cells", *Bioelectrochem.*, 51(2), Junio, 2000: 117-123.

II.2.- CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE FRECUENCIA INFERIOR A LA RADIOFRECUENCIA

Los campos electromagnéticos de frecuencia inferior a la radiofrecuencia son los constituidos por los campos estáticos y las radiaciones electromagnéticas con frecuencias más bajas (de 0 Hz a 100 kHz). Comprenden, a su vez, tres zonas fundamentales, la más energética de las cuales es la correspondiente al intervalo de frecuencias de la voz humana. El margen audible de percepción en los seres humanos está comprendido teóricamente entre los 20 y los 20.000 Hz, y los límites de la longitud de onda en el margen de frecuencias audibles son de 17m para una frecuencia de 20 Hz y 17mm para 20.000 Hz.³³

En la tabla 2 se muestran las principales fuentes generadoras de campos de frecuencia inferior a la radiofrecuencia. Entre ellas, como podemos ver, se cuentan las líneas de alta tensión y los aparatos electrodomésticos, que constituyen la principal preocupación en esta materia. Como ya se ha señalado, los campos magnéticos de muy baja frecuencia no provocan patología inmediata sobre los seres vivos. Los efectos que han sido sacados a la luz por estudios epidemiológicos relacionados con las bajas frecuencias, atañen a la inducción de tumores cerebrales, principalmente en niños, y a casos de leucemia, aunque estos estudios están aún sin refrendar por la totalidad de la comunidad científica.

³³ Recuero, M., "Ingeniería acústica", Paraninfo, Madrid, 1989.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Campos estáticos ³⁴	Campos de extremadamente baja frecuencia ³⁵	Campos de extremadamente baja frecuencia ³⁶
Técnicas de resonancia magnética nuclear: 1.600.000 A/m	Horno de fundición (en sus inmediaciones): 80-8.000 A/m	Subestación eléctrica: 20.000 V/m
Proceso industrial de electrolisis: 6.400 A/m	Electrodomésticos (en sus inmediaciones): 8-800 A/m	Debajo de una línea eléctrica de 400 kV: 10.000 V/m
Producción de imanes permanentes: 400 A/m	Debajo de una línea de 400 kV: 32 A/m	A 25 m de una línea eléctrica de potencia: 1.000 V/m
Campo magnético de la tierra (valor máximo): 54 A/m	A 25 m de una línea eléctrica de alta tensión: 6 A/m	Electrodomésticos (en sus inmediaciones): 10-250 V/m
	En los hogares (como promedio): 0,08-0,8 A/m	En los hogares (como promedio): 1-10 V/m

Tabla 2: Principales fuentes de campos electromagnéticos de frecuencia inferior a la radiofrecuencia

De esta manera, los trabajos de revisión publicados hasta la fecha sobre baja frecuencia señalan que, aunque los efectos de los campos electromagnéticos no están demostrados, no existe momentáneamente ninguna certeza sobre su inocuidad. Ello explica la incertidumbre reinante en los ambientes científico y social sobre los posibles perjuicios para la salud de las líneas de alta tensión y de tendidos eléctricos de menor envergadura situados próximos a viviendas. De momento, la exposición a campos electromagnéticos de cierta intensidad, no puede ser considerada como totalmente inocua.

³⁴ Las fuentes de radiación que aparecen en esta columna generan un campo magnético estático, cuya densidad se mide en amperios/ metro.

³⁵ Las fuentes de radiación aquí citadas generan un campo magnético, cuya densidad de flujo es medida en amperios/ metro

³⁶ Las fuentes de radiación aquí citadas generan un campo eléctrico, cuya fuerza es medida en voltios/ metro.

Hay que tener en cuenta, al respecto, el hecho de que la obtención de efectos en el laboratorio se consigue únicamente con intensidades de campo muy superiores a aquéllas a las que habitualmente nos encontramos expuestos, aunque no resulta desatinado pensar que dichos efectos podrían inducirse en casos de exposición crónica a intensidades inferiores.

Además de las líneas de alta tensión y los electrodomésticos, que generan en nuestro hogar campos magnéticos de las frecuencias en estudio, otros emisores a considerar son las fuentes industriales de elevado voltaje. Éstas funcionan a frecuencias de 50 Hz, por lo que no sería acertado descartar la posibilidad de que puedan afectar a los seres vivos.³⁷

II.2.1.- El sistema eléctrico y su relación con los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia

Al contrario de lo que sucede con las fuentes de energía (gas, petróleo, carbón, etc.), la electricidad no se puede almacenar en grandes cantidades: toda la energía eléctrica necesaria en un momento determinado tiene que generarse de forma simultánea a cuando se consume.

³⁷ Alpunte, J. y Ramos, J.L., "Radiaciones no ionizantes en la vida cotidiana. Efectos y Protección", *Jornadas sobre Radiaciones No Ionizantes en Biología y Medicina*, Instituto Bioelectromagnetismo "Alonso de Santa Cruz". Editor: J.L. Bardasano, 1992.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Para ello se necesita un equilibrio permanente y complejo entre generación y consumo, y una red de transporte que distribuya esa electricidad allá donde ésta sea necesaria: hogares, escuelas, hospitales, industrias, etc.

En España, al igual que en toda Europa occidental, la energía eléctrica que se produce en las centrales es transportada por todo el país a través de las líneas eléctricas conocidas habitualmente como “de alta tensión”, a 220.000 ó 400.000 voltios (220 ó 400 kV). Aunque en otros países, como Estados Unidos, Canadá, Rusia o Brasil se alcanzan 750 kV, y en Japón existe incluso una línea eléctrica a 1.000 kV.

Las subestaciones eléctricas constituyen los nodos de la red de transporte, y su función consiste en distribuir la energía por cada línea en función de la generación y consumo de cada zona, transformándola a tensiones inferiores para alimentar a la red de media tensión, que suministra a centros urbanos y grandes industrias. En los centros urbanos la energía a media tensión llega a los transformadores, que la distribuyen por la red.

Mediante un adecuado mallado de líneas y subestaciones de alta tensión que cubra todo el territorio se consigue una red de transporte de energía eléctrica segura y fiable, capaz de minimizar las pérdidas y garantizar el suministro a toda la población.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

El sistema eléctrico funciona a una frecuencia extremadamente baja, 50 Hz (40 ó 60 Hz en algunos países americanos), conocida como 'frecuencia industrial', y perteneciente, como ya se ha visto, a la región de las radiaciones no ionizantes del espectro. Por lo tanto, los campos de frecuencia industrial son muy poco energéticos e incapaces, en principio, de afectar al material genético de las células.

Además, a frecuencias tan bajas, los campos eléctrico y magnético están desacoplados y no pueden viajar por el espacio (como lo hacen, por ejemplo, las ondas de radio), lo que implica que su intensidad disminuye muy rápidamente al alejarse de la fuente que los genera.

Cuando los cables conductores de las líneas eléctricas son sometidos a una determinada tensión, se genera un campo eléctrico; a su vez, resulta generado un campo magnético cuando fluye por ellos una corriente eléctrica. Su intensidad depende de diversos factores, como la tensión, la intensidad de la corriente eléctrica, diseño del apoyo, número de conductores, altura de los cables al suelo, etc.

Las mediciones realizadas en líneas españolas de 400 kV proporcionan valores máximos, justo debajo de los conductores -y medidos a 1 metro de altura del suelo como indica la normativa internacional-, que oscilan entre 3-5 kV/m para el campo eléctrico y 1-20 μ T para el campo magnético. En líneas de menor

tensión los valores máximos de campo eléctrico y magnético son, asimismo, inferiores. Así, por ejemplo, a 30 metros de distancia de una línea eléctrica a 400 kV, el nivel de campo eléctrico oscila entre 0,1-1,3 kV/m, y el de campo magnético entre 0,2-2 μ T, siendo inferior a 0,1 kV/m y 0,1 μ T a partir de 100 metros de distancia.³⁸

Una característica importante del campo eléctrico es que, al contrario que el campo magnético, es apantallado por muchos materiales comunes. En particular, las paredes y techos de los edificios hacen que el nivel de campo eléctrico en el interior de un inmueble sea prácticamente nulo, aunque esté situado debajo de una línea eléctrica de alta tensión.

En el interior del 'parque' de una subestación de 400 kV, es decir, en la zona donde está toda la aparamenta eléctrica y el paso está restringido únicamente a los trabajadores, los niveles de campo eléctrico y magnético pueden ser superiores a los generados por las líneas. Sin embargo, disminuyen aún más rápidamente al alejarnos, de tal manera que fuera del perímetro de la subestación, en los lugares accesibles al público, los niveles de campo eléctrico y magnético serán incluso inferiores a los que generan las propias líneas eléctricas que llegan hasta ella.

³⁸ Datos procedentes de Red Eléctrica de España, Dpto. de Medio Ambiente, "Plan de medidas de campo eléctrico, campo magnético y ruido audible en líneas eléctricas de alta tensión", Madrid, 1997.

Todo aparato o equipo que funciona con energía eléctrica genera unos campos eléctricos y magnéticos de las mismas características, y a veces incluso más intensos, que los originados por las propias instalaciones de alta tensión, al estar mucho más cerca del usuario. A modo de ejemplo, una maquinilla de afeitar o un secador de pelo puede inducir en la piel del usuario un campo magnético hasta diez veces más intenso que el generado por una línea eléctrica a 400 kV.

Si bien es verdad que los datos objetivos resultan tranquilizadores, no deja de ser arriesgado descartar el hecho de que una exposición crónica a los campos electromagnéticos originados por la red eléctrica, pese a las características aparentemente inofensivas que hemos expuesto, no posea efecto alguno en el organismo de las personas a ellos expuestas, a través de los mecanismos conocidos o de otros aún sin estudiar, como a continuación se expondrá.

II.2.2.- Revisión de bioefectos relevantes para exposiciones a frecuencias de 0 Hz a 100 kHz

II.2.2.a.- Epidemiología de cáncer y enfermedades neurodegenerativas en humanos

Tomados en su conjunto, los datos sobre riesgos de cáncer asociados a la exposición a campos de frecuencias muy bajas (ELF) en sujetos que viven en las proximidades de líneas de distribución eléctrica, muestran una aparente consistencia, revelando un moderado incremento en la incidencia

de leucemia en niños y no en la de otros tipos de cáncer. Las bases de una supuesta relación entre leucemia y exposición a campos ELF son desconocidas, por lo que algunos investigadores especulan sobre la posibilidad de que otros factores, generalmente agentes contaminantes químicos, potencialmente ligados a la presencia de las líneas de distribución eléctrica, pudieran ser los verdaderos causantes de la débil asociación descrita.

Existen asimismo datos sobre incrementos en el riesgo de ciertos tipos de cáncer, tales como leucemia, tumores del sistema nervioso y cáncer de mama en trabajadores expuestos crónicamente a campos relativamente intensos.³⁹

De la misma manera, un reciente grupo de estudios epidemiológicos ha revelado una tendencia al incremento de riesgo de algunas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y esclerosis múltiple, mayormente) en trabajadores de empresas e industrias relacionadas con la generación y distribución de energía eléctrica.⁴⁰

³⁹ Floderus, B.; Tornquist, S. y Stenlund, C., "Incidence of selected cancers in Swedish railway workers, 1961-79", *Cancer Causes Control*, 5(2), Marzo, 1994: 189-194.; Tynes, T.; Hannevik, M.; Andersen, A.; Vistnes, A.I. y Haldorsen, T., "Incidence of breast cancer in Norwegian female radio and telegraph operators", *Cancer Causes Control*, 7(2), Marzo, 1996: 197-204; Feychting, M.; Pedersen, N.L.; Svedberg, P.; Floderus, B. y Gatz, M., "Dementia and occupational exposure to magnetic fields", *Scand. J. Work Environ. Health*, 24(1), Febrero, 1998: 46-53.

⁴⁰ Davanipour, Z.; Sobel, E.; Bowman, J.D.; Qian, Z. y Will, A.D., "Amyotrophic lateral sclerosis and occupational exposure to electromagnetic fields", *Bioelectromagnetics*, 18(1), 1997: 28-35; Johansen, C.; Koch-Henriksen, N.; Rasmussen, S. y Olsen, J.H., "Multiple sclerosis among utility workers", *Neurology*, 52(6), Abril, 1999: 1279-1282.

La metodología empleada en muchos de estos estudios es objeto de crítica debido a una ausencia de dosimetría de campos para dichos trabajadores, así como a la existencia de posibles factores de confusión (presencia de tóxicos volátiles en el medio laboral, por ejemplo), que no fueron tenidos en cuenta en algunas de las investigaciones.

II.2.2.b.- *Datos experimentales sobre efectos cancerígenos*

- **Cáncer de mama en animales:** no existe evidencia de que los campos de 50- 60 Hz puedan provocar efectos cancerígenos a través de alteraciones en la estructura del ADN. Por tanto, es improbable que dichos campos actúen como *iniciadores* del proceso de transformación neoplásica.⁴¹

Si estos campos resultasen ser cancerígenos, actuarían más bien como *promotores*, acelerando el crecimiento (o impidiendo la muerte) de células que hubieran sufrido un daño genético anterior. Tales efectos podrían darse a través de alteraciones en las vías de señalización celular o en la expresión génica. En general, entre los estudios dirigidos a detectar posibles efectos de campos de 50- 60 Hz en la evolución de tumores previamente iniciados mediante distintos tipos de carcinógenos (químicos o radiaciones ionizantes), aquellos que han detectado un efecto

⁴¹ Tenforde, en: *Biological Effects of Electromagnetic Fields*. Polk y Postow, eds., CRC Press, Boca Ratón, 1996: 185; Hulka, B.S. y Moorman, P.G., "Breast cancer: hormones and other risk factors", *Maturitas*, 38(1), Febrero, 2001: 103-113.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

carcinógeno, lo han hecho en tumores de piel o de mama, y en animales expuestos a campos muy intensos (de hasta 2 mT).⁴² Únicamente dos trabajos, procedentes de un mismo laboratorio, han mostrado una tendencia al incremento en la tasa de desarrollo tumoral en ratas expuestas a campos débiles, en el rango de las microteslas.⁴³ No obstante, un intento de réplica independiente de estos estudios, realizado recientemente, no tuvo éxito. En tanto los estudios citados no sean replicados y, en su caso, ampliados mediante investigaciones independientes, no es posible emitir conclusiones acerca de los posibles efectos de los campos de muy baja frecuencia sobre la promoción tumoral en cáncer de mama.

- **Otras formas de cáncer en animales:** existe poca evidencia indicativa de que campos magnéticos de ELF tengan un efecto cáncer-promotor, a excepción de los anteriormente citados sobre tumores mamarios. Aún así, la Comisión ICNIRP entiende que son necesarios estudios más completos sobre modelos animales para clarificar los posibles efectos de los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia sobre las señales celulares y la regulación neuroendocrina, factores que pueden influir en el desarrollo de

⁴² Liburdy y Löscher, en: *The Melatonin Hypothesis, Breast Cancer and Use of Electric Power*, Stevens, Wilson y Anderson, eds., Battelle Press, Columbus, 1997: 585.

⁴³ Mevissen, M.; Stamm, A.; Buntenkotter, S.; Zwingelberg, R.; Wahnschaffe, U. y Löscher, W., "Effects of magnetic fields on mammary tumor development induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats", *Bioelectromagnetics*, 14(2), 1993: 131-143; Löscher, W.; Wahnschaffe, U.; Mevissen, M.; Lerchl, A. y Stamm, A., "Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats", *Oncology*, 51(3), Mayo- Junio, 1994: 288-295 .

tumores a través de la promoción de la división en células previamente iniciadas.

- **La hipótesis de la melatonina:** la melatonina, el mediador químico de la glándula pineal, es sintetizada y secretada por dicha glándula siguiendo un ciclo circadiano de luz- oscuridad ambiental.

Los resultados de diversos estudios indican que la melatonina y sus análogos pueden actuar como poderosos oncostáticos, alterando el crecimiento de células cancerosas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, la administración de melatonina se ha mostrado efectiva en la supresión de cáncer mamario inducido por el carcinógeno químico DMBA.⁴⁴

Según la denominada *Hipótesis de la Melatonina*⁴⁵ una reducción en los niveles de melatonina en sangre causada por exposiciones a CEM, provocaría una disregulación de la síntesis de esteroides y un incremento de la incidencia de cánceres hormona- dependientes (mama, próstata). En efecto, existe evidencia de que campos eléctricos y magnéticos relativamente débiles, de 50- 60 Hz, pueden suprimir la síntesis de

⁴⁴ Kothari, L. y Subramanian, A., "A possible modulatory influence of melatonin on representative phase I and II drug metabolizing enzymes in 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced rat mammary tumorigenesis", *Anticancer Drugs*, 3(6), Diciembre, 1992: 623-628.

⁴⁵ Stevens, R.G.; Davis, S.; Thomas, D.B.; Anderson, L.E. y Wilson, B.W. "Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer", *FASEB. J.*, 6(3), Febrero, 1992: 853-860.

melatonina en algunos mamíferos (roedores, generalmente).⁴⁶

Por el contrario, otros trabajos no encuentran alteraciones en los niveles de metabolitos de melatonina, ni sobre el metabolismo de la glándula pineal en roedores expuestos a campos electromagnéticos.⁴⁷ De la misma manera, tampoco se han encontrado efectos consistentes de campos electromagnéticos sobre la síntesis de melatonina en otros animales, tales como ovejas y primates.⁴⁸

Por lo que se refiere a trabajos sobre voluntarios humanos, se ha experimentado sometiendo a los sujetos a exposiciones cortas (una noche) a CEM de 50 ó 60 Hz, y de 1 μ T, 20 μ T ó 100 μ T.⁴⁹ Estos trabajos no mostraron cambios significativos en la concentración de melatonina en

⁴⁶ Así, se ha descrito una disminución de la concentración de melatonina en suero de ratas (Selmaoui, B. y Touitou, Y., "Sinusoidal 50-Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin. Role of duration and intensity of exposure", *Life Sci.*, 57(14), 1995: 1351-1358), hámsters (Yellon, S.M., "Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster", *J. Pineal Res.*, 16(3), Abril, 1994: 136-144) y ratones (Löscher et al., 1994, op. cit., 288) expuestos a campos magnéticos.

⁴⁷ John, T.M.; Liu, G.Y. y Brown, G.M., "60 Hz magnetic field exposure and urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in the rat", *Bioelectromagnetics*, 19(3), 1998: 172-180, no encontraron alteración en los niveles de 6-sulfatoxymelatonina, principal metabolito de la melatonina, en ratas expuestas a CM. Tampoco Levine, R.L.; Dooley, J.K. y Bluni, T.D., "Magnetic field effects on spatial discrimination and melatonin levels in mice", *Physiol. Behav.*, 58(3), Septiembre, 1995: 535-537, describen efectos sobre el metabolismo de la glándula pineal en ratones expuestos a campos magnéticos.

⁴⁸ Rogers, N. et al., en: *The Melatonin Hypothesis*, Stevens, Wilson y Anderson, eds., Battelle Press, Columbus, Richland, 1997: 429; Rogers, N.; van-den-Heuvel, C. y Dawson, D., "Effect of melatonin and corticosteroid on in vitro cellular immune function in humans", *J. Pineal. Res.*, 22(2), Marzo, 1997: 75-80.

⁴⁹ Graham, C.; Cook, M.R.; Riffle, D.W.; Gerkovich, M.M. y Cohen, H.D., "Nocturnal melatonin levels in human volunteers exposed to intermittent 60 Hz magnetic fields", *Bioelectromagnetics*, 17(4), 1996: 263-273; Graham, C. et al., *Bioelectromagnetics*, 18, 1996b: 166.

suero de los sujetos a estudio. Sin embargo, algunos trabajos más recientes sí han proporcionado indicios de efectos sobre niveles de melatonina y/o sobre el sueño, en sujetos expuestos en su medio laboral⁵⁰ y en voluntarios sometidos a campos intensos.⁵¹ En estos casos los efectos resultaron ser sutiles, se detectaron en una baja proporción de sujetos y desaparecían inmediatamente una vez eliminada la exposición.

II.2.3- Uso médico de los campos electromagnéticos

II.2.3.a.- *Magnetoterapia*

Los imanes naturales como la magnetita o calamita han sido utilizados con fines terapéuticos desde muy antiguo y en culturas tan dispares como la india, la egipcia, griega, romana o árabe. El siglo XVIII, con el surgir de los conocimientos científicos sobre la electricidad, marca el inicio de su empleo como agente terapéutico: es la época del “mesmerismo”. Este método psicoterapéutico propugnado por el médico austríaco Mesmer,⁵² vinculando el magnetismo con la magia, postulaba la existencia de un “magnetismo animal”, un fluido relacionado con el magnetismo terrestre, capaz de ser

⁵⁰ Burch, J.B.; Reif, J.S.; Yost, M.G.; Keefe, T.J. y Pitrat, C.A., “Reduced excretion of a melatonin metabolite in workers exposed to 60 Hz magnetic fields”, *Am. J. Epidemiol.*, 150(1), Julio, 1999: 27-36.

⁵¹ Åkerstedt, T.; Arnetz, B.; Ficca, G.; Paulsson, L.E. y Kallner, A., “A 50-Hz electromagnetic field impairs sleep”, *J. Sleep Res.*, 8(1), Marzo, 1999: 77-81; Graham, C. et al., 1996, op. cit., 263.

⁵² Franz A. Mesmer (1734-1815), médico austríaco que desarrolló en Viena su doctrina terapéutica, el mesmerismo, obligándole su práctica a trasladarse a París, donde alcanzó un innegable triunfo popular. Hoy día se cree que las curaciones conseguidas por Mesmer pueden ser explicadas fácilmente por simples fenómenos de sugestión.

activado y transmitido de uno a otro ser mediante pases de manos, y que intervendría de forma importante en los procesos fisiológicos. La técnica curadora de Mesmer se desarrolló y mantuvo su vigencia a lo largo de buena parte del siglo XIX.

Una vez superadas estas ideas, y gracias al avance de la investigación científica en la materia, aparece el concepto actual de magnetoterapia, entendida como una técnica terapéutica consistente en aplicar campos magnéticos artificiales sobre una zona determinada del cuerpo humano con fines médicos, controlando la frecuencia e intensidad de dichos campos.

Así pues, al llevar a la práctica médica las bases físicas de los campos electromagnéticos, se procede a hacer circular una corriente eléctrica por un conductor. No se utilizan los campos continuos con este fin, ya que resulta difícil, en la práctica, crear campos uniformes de gran extensión; además, la producción de calor en este caso sería continua debida al efecto Joule. Los campos variables presentan asimismo esta característica, pero evidentemente el calentamiento que éstos provocan es mucho menor y se atenúa rápidamente merced a los mecanismos termo-reguladores del organismo. Los CEM utilizados en magnetoterapia son aquellos de baja frecuencia e intensidad ⁵³ (generalmente menos de 150 Gauss), presentando, los más comunes, frecuencias de 40 G.

⁵³ Algunos autores distinguen entre magnetoterapia y magnetosteogenia, según sea la frecuencia del campo utilizado baja o media. Al efecto de realizar una adecuada descripción de los efectos biológicos de estos campos, vamos a aunar ambos términos hablando únicamente de magnetoterapia para referirnos a ambas frecuencias.

Los generadores utilizados hoy día en magnetoterapia varían en lo que se refiere al solenoide, a la forma de onda, a la frecuencia y a la intensidad del campo aplicado. Los más habituales son los que aplican el campo en forma de impulsos, que, a su vez, pueden ser sinusoidales, rectangulares, en onda “tres cuartos”, etc. El solenoide suele estar incluido en un cilindro de material plástico a fin de facilitar su limpieza, pudiendo ser fijo o móvil, montado sobre un sistema de rieles con un pequeño motor que lo desplaza sobre la zona programada, bien sea el cuerpo entero o una zona determinada de éste.

II.2.3.b.- *Efectos terapéuticos de los campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia*

Resulta tan complicado tratar de los efectos beneficiosos de los campos magnéticos como de los adversos,⁵⁴ debido al estado actual de las investigaciones, máxime cuando la verificación técnica en numerosos procesos biológicos no es factible hoy en día y muchos trabajos, lejos de establecer conclusiones, lo que hacen es plantear hipótesis. Asimismo resulta difícil relacionar los fenómenos que los campos magnéticos producen sobre los medios biológicos con las acciones terapéuticas a que pueden dar lugar. Dentro de los mencionados efectos, describiremos, en primer lugar, el de

⁵⁴ En relación a los posibles efectos adversos de CEM pulsantes a frecuencias terapéuticas, se ha publicado recientemente el estudio *in vitro* sobre los efectos de éstos y su interacción con la melatonina en células cancerígenas, llegando a la conclusión de que dichos campos no tienen ninguna influencia en la metástasis. (Leman, E.S.; Sisken, B.F.; Zimmer, S. y Anderson, K.W., “Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells”, *Bioelectromagnetics*, 22(3), Abril, 2001: 178-184).

magnetización, responsable de la orientación de moléculas y átomos bipolares al que podríamos definir como efecto biológico primario. Un efecto secundario sería el piezoeléctrico o magnetostricción y, completando a los dos anteriores, cabría mencionar en tercer lugar un efecto metabólico responsable de los procesos derivados del trofismo y la reparación tisular.

- a) Efecto de magnetización: que favorece los procesos de difusión a través de la membrana celular, al provocar un aumento en su permeabilidad.⁵⁵ En cuanto al transporte activo, que implica un consumo de energía, el elemento de la membrana más importante para lograr los intercambios iónicos a través de la misma, es la bomba de sodio/potasio, transporte activo común para todas las células y cuya función consiste en hacer salir los iones Na^+

⁵⁵ A este respecto hay multitud de estudios publicados, por lo que solo citaremos aquí algunos como los de Braganza, L.F.; Blott, B.H.; Coe, T.J. y Melville, D., "The superdiamagnetic effect of magnetic fields on one and two component multilamellar liposomes", *Biochim. Biophys. Acta.*, 801(1), Septiembre, 1984: 66-75; Zimmermann, U.; Vienken, J.; Pilwat, G. y Arnold, W.M., "Electro-fusion of cells: principles and potential for the future", *Ciba. Found. Symp.*, 103, 1984: 60-85; McLeod, B.R. y Liboff, A.R., "Dynamic characteristics of membrane ions in multifield configurations of low-frequency electromagnetic radiation", *Bioelectromagnetics.*, 7(2), 1986: 177-189; Goodman, E.M.; Sharpe, P.T.; Greenebaum, B. y Marron, M.T., "Pulsed magnetic fields alter the cell surface", *FEBS. Lett.*, 199(2), Abril, 1986: 275-278; Farndale, R.W.; Maroudas, A. y Marsland, T.P., "Effects of low-amplitude pulsed magnetic fields on cellular ion transport", *Bioelectromagnetics.*, 8(2), 1987: 119-134; Rosenblatt, C.; Yager, P. y Schoen, P.E., "Orientation of lipid tubules by a magnetic field", *Biophys. J.*, 52(2), Agosto, 1987, 295-301; Halle, B., "On the cyclotron resonance mechanism for magnetic field effects on transmembrane ion conductivity", *Bioelectromagnetics.*, 9(4), 1988: 381-385; Omote, Y.; Nakajima, S.; Samejima, N.; Kobayashi, S.; Nakajima, S. y Suzuki, T., "Effects of low-frequency pulsing magnetic field upon the respiratory metabolism and transmembrane ion fluxes of perfused rat livers", *Hokkaido. Igaku. Zasshi.*, 63(2), Marzo, 1988: 240-249; Kinouchi, Y.; Tanimoto, S.; Ushita, T.; Sato, K.; Yamaguchi, H. y Miyamoto, H., "Effects of static magnetic fields on diffusion in solutions", *Bioelectromagnetics.*, 9(2), 1988: 159-166; Liboff, A.R. y McLeod, B.R., "Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields", *Bioelectromagnetics.*, 9(1), 1988: 39-51; Aoki, H.; Yamazaki, H.; Yoshino, T. y Akagi, T., "Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line", *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 69(1), Julio, 1990: 103-106; Jacobson, J.I., "Is the fusion process the basis for growth, repair and aging?", *Panminerva. Med.*, 32(3), Julio-Septiembre, 1990: 132-140; Neumann, E., "Disgression on chemical...", op. cit., 43-49.

excesivos cuando la concentración intracelular de éstos rebasa los 12 moles/ml; al mismo tiempo la bomba transporta hacia el interior de la célula un ión K^+ que había salido por difusión simple. Este mecanismo de bombeo activo de Na^+ fuera de la célula es el responsable del mantenimiento de un potencial negativo intracelular de 50 mV; el efecto de magnetización mejora la función de la bomba Na^+/K^+ mediante el aporte a ésta de energía capaz de disminuir el consumo de oxígeno.

Por otra parte, los campos magnéticos, al llevar a cabo una orientación de los dipolos magnéticos, pueden influir, según los casos, facilitando o inhibiendo el proceso de acoplamiento receptor-membrana y sustancia complementaria en procesos que llevan información por un enlace específico, como son los complejos receptor-hormona, receptor-transmisor y antígeno-anticuerpo⁵⁶.

b) Efecto de magnetostricción: la piezoelectricidad es un efecto propio de las estructuras anisótropo-cristalinas, como el colágeno, sobre todo a nivel óseo; obedece a la relación directa entre vibraciones y oscilaciones elásticas y eléctricas, ya que es motivado por inducción de corrientes que originan diferencias de potencial y puesta en movimiento de cargas eléctricas. Se posibilita así la obtención en el hueso de polarizaciones eléctricas con

⁵⁶ Chiles, C.; Hawrot, E.; Gore, J. y Byck, R., "Magnetic field modulation of receptor binding", *Magn. Reson. Med.*, 10(2), Mayo, 1989: 241-245.

orientación arquitectónica de las trabéculas, lo que origina un callo óseo mejor formado o, lo que es lo mismo, de más calidad. Por otra parte, como el colágeno tiene un papel importante en todos los procesos de reparación y crecimiento, es fácilmente deducible el efecto trófico-estimulante de los campos magnéticos, habiendo sido evidenciado en procesos de cicatrización, reparación de tejidos, aceleración de la formación del callo óseo y, en general, en todos los procesos de reconstrucción tisular⁵⁷.

c) Efecto metabólico: es el responsable de los procesos trófico-estimulantes de reparación tisular. Entre los principales procesos que se derivan de este efecto, cabe destacar: la estimulación de la síntesis de ácido hialurónico, el efecto piezoeléctrico en el tejido colágeno ya descrito; la inducción de la proliferación fibroblástica, motivada a la vez por el estímulo de la actividad mitótica y de la citada síntesis de ácido hialurónico; la estimulación de la neoformación capilar y promoción de vaso-dilatación, evidenciada por el calentamiento de los tejidos; el aumento de la presencia de pericitos en los capilares y apertura de los esfínteres precapilares, posiblemente por estímulo hipotalámico (asimismo la neocapilarización obedece a una migración de células endoteliales); el aumento

⁵⁷ Barker, A.T. y Lunt, M.J., "The effects of pulsed magnetic fields of the type used in the stimulation of bone fracture healing", *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, 4(1), Febrero, 1983: 1-27; Ottani, V.; Monti, M.G.; Piccinini, G.; Pernecco, L.; Zaniol, P.; Ruggeri, A. y Barbiroli, B., "Pulsed electromagnetic fields increase the rate of rat liver regeneration after partial hepatectomy", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 176(4), Septiembre, 1984: 371-377; Law, H.T.; Annan, I.; McCarthy, I.D.; Hughes, S.P.; Stead, A.C.; Camburn, M.A. y Montgomery, H., "The effect of induced electric currents on bone after experimental osteotomy in sheep", *J. Bone. Joint. Surg. Br.*, 67(3), Mayo, 1985: 463-469; Bruce, G.K.; Howlett, C.R. y Huckstep, R.L., "Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius. Preliminary results", *Clin. Orthop.*, (222), Septiembre, 1987: 300-306.

de la presión parcial de oxígeno (PO), que favorece la formación de oxihemoglobina y el estímulo de la respiración tisular mediante activación de los sistemas de óxido-reducción a nivel ribosomal y de la cadena enzimática de la respiración celular en los citocromos, con disminución, por tanto, del gasto de oxígeno; la disminución de la viscosidad sanguínea, por una reducción relativa de la carboxihemoglobina; la activación de la circulación linfática y de la función plaquetaria, así como la estimulación de neutrófilos y macrófagos; la diferenciación de la matriz amorfa de las fibras de colágeno y, por último, la transformación del ADP en ATP a nivel mitocondrial.⁵⁸

⁵⁸ Existen numerosos estudios sobre los efectos metabólicos de los CEM desde los años sesenta hasta la actualidad; podemos así citar, por ejemplo, los de Pereira, M.R.; Nutini, L.G.; Fardon, J.C. y Cook, E.S., "Cellular respiration in intermittent magnetic fields", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124(2), Febrero, 1967: 573-576; Rabinovitch, B.; Maling, J.E. y Weissbluth, M., "Enzyme-substrate reactions in very high magnetic fields", *Biophys. J.*, 7(2), Marzo, 1967: 187-204; Friedman, H.; Becker, R.O. y Bachman, C.H., "Effect of magnetic fields on reaction time performance", *Nature*, 213(79), Marzo, 1967: 949-950; Fardon, J.C.; Poydock, M.E. y Basulto, G., "Effect of magnetic fields on the respiration of malignant, embryonic and adult tissue", *Nature*, 211(47), Julio, 1966: 433; Barnothy, M.F. y Barnothy, J.M., "Magnetic fields and the number of blood platelets", *Nature*, 225(238), Marzo, 1970: 1146-1147; Cerny, R., "The biological effects of implanted magnetic fields. Part 1. Mammalian blood cells", *Aust. Orthod. J.*, 6(2), Octubre, 1979: 64-70; Bernhardt, J., "The direct influence of electromagnetic fields on nerve and muscle cells of man within the frequency range of 1 Hz to 30 MHz", *Radiat. Environ. Biophys.*, 16(4), 1979: 309-323; Freyssinet, J.M.; Torbet, J. y Hudry-Clergeon, G., "Fibrinogen and fibrin in strong magnetic fields. Complementary results and discussion", *Biochimie.*, 66(2), Febrero, 1984: 81-85; Ottani, V. et al., "Pulsed electromagnetic fields increase...", op. cit., 371-377; Zarankova, V. y Chifchiiski, S., "Enzyme histochemical studies of gum papillae in parodontopathia dystrophica after treatment with magnetotherapy", *Folia. Med. Plovdiv.*, 28(4), 1986: 35-44; Farndale, R.W. et al., "Effects of low-amplitude pulsed magnetic fields...", op. cit., 119-134; Rosenblatt, C. et al., "Orientation of lipid tubules...", op. cit., 295-301; Valberg, P.A. y Feldman, H.A., "Magnetic particle motions within living cells. Measurement of cytoplasmic viscosity and motile activity", *Biophys. J.*, 52(4), Octubre, 1987: 551-561; Okazaki, M.; Kon, K.; Maeda, N. y Siga, T., "Distribution of erythrocyte in a model vessel exposed to inhomogeneous magnetic fields", *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*, 20(1), 1988: 3-14; Omote, Y. et al., "Effects of low-frequency pulsing magnetic field upon the respiratory metabolism...", op. cit., 240-249; Chiles, C. et al., "Magnetic field modulation...", op. cit., 241-245; Keltner, J.R.; Roos, M.S.; Brakeman, P.R. y Budinger, T.F., "Magnetohydrodynamics of blood flow", *Magn. Reson. Med.*, 16(1), Octubre, 1990: 139-149; Carson, J.J.; Prato, F.S.; Drost, D.J.; Diesbourg, L.D. y Dixon, S.J., "Time-varying magnetic fields increase cytosolic free Ca²⁺ in HL-60 cells", *Am. J. Physiol.*, 259(4 Pt 1), Octubre, 1990: C687-692.

II.3.- CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RADIOFRECUENCIA

La radiofrecuencia (RF) es la parte del espectro electromagnético situado en la zona de las radiaciones no ionizantes, con frecuencias entre los 3 kHz y los 300 GHz, lo que incluye a las ondas de radio y las microondas.

Entre las fuentes más comunes de campos de radiofrecuencia cabe citar los monitores y pantallas (3 - 30 kHz), aparatos de radio de amplitud modulada (30 kHz - 3 MHz), calentadores industriales por inducción (0,3 - 3 MHz), termoselladores, aparatos de diatermia quirúrgica (3 - 30 MHz), aparatos de radio de frecuencia modulada (30 - 300 MHz), teléfonos móviles, receptores de televisión, hornos microondas, (0,3 - 3 GHz), aparatos de radar, dispositivos de enlace por satélite, sistemas de comunicaciones por microondas (3 - 30 GHz) y radiaciones solares (3 - 300 GHz).

Los campos de radiofrecuencia son, como integrantes del grupo de los denominados campos electromagnéticos, radiaciones no ionizantes, por lo que, como ya se ha indicado para este tipo de radiación, resultan demasiado débiles para romper los enlaces que mantienen unidas las moléculas en las células, de ahí que no sean capaces de producir ionización. Sin embargo, estos campos de radiofrecuencia pueden causar diferentes efectos en sistemas biológicos tales como células aisladas, vegetales, o animales, efectos que dependen de la frecuencia e intensidad del campo. Ahora bien, no todos ellos son necesariamente perjudiciales para la salud .

Fuentes naturales de radiaciones de radiofrecuencia

Los campos de radiofrecuencia procedentes de fuentes naturales tienen potencias específicas muy bajas, a las que los organismos están perfectamente adaptados. Así, la densidad de potencia de los rayos solares, principal fuente natural de este tipo de radiación, es inferior a $0,01 \text{ mW/m}^2$.

Fuentes artificiales de radiaciones de radiofrecuencia

La mayor parte de los campos de radiofrecuencia proceden de receptores de radio, televisión y equipos de telecomunicaciones. En los Estados Unidos, país en el que más amplia y tempranamente se ha estudiado este tema, el promedio básico de los niveles de radiofrecuencia registrados en grandes ciudades se sitúa en torno a $50 \text{ } \mu\text{W/m}^2$. Aproximadamente el 1% de la población de las grandes ciudades se halla expuesto a campos de radiofrecuencias superiores a $10 \text{ } \mu\text{W/m}^2$. En zonas situadas en las inmediaciones de emplazamientos de transmisores o sistemas de radar se pueden registrar niveles mucho más elevados.

1. En los hogares: entre las fuentes domésticas de radiofrecuencia figuran los hornos de microondas, los teléfonos móviles, los dispositivos de alarma antirrobo, las pantallas de ordenador y los televisores. Los hornos de microondas, que en principio podrían originar niveles de radiofrecuencia muy elevados, están sujetos a normas estrictas de calidad que imposibilitan las fugas. El nivel básico de radiofrecuencia de los aparatos electrodomésticos es bajo, del orden de decenas de $\mu\text{W/m}^2$.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

2. En los puestos de trabajo: existen varios procesos industriales que utilizan campos de radiofrecuencia, como por ejemplo, los calentadores dieléctricos empleados para laminación de maderas y sellado de plásticos, los calentadores por corrientes de inducción y los hornos de microondas de uso industrial; asimismo los equipos de diatermia quirúrgica (utilizados para tratar el dolor y la inflamación de tejidos), y la electro- cirugía, generan este tipo de frecuencia. Los campos electromagnéticos de radiofrecuencia provocados por los equipos empleados en el lugar de trabajo, pueden ser, en las proximidades de dichos equipos, superiores a varias decenas de W/m^2 . Todos esos niveles de exposición están reglamentados a nivel nacional e internacional, como se verá posteriormente.

Las personas que trabajan en los sectores de la radiodifusión, el transporte y las comunicaciones, al realizar su actividad muy cerca de antenas transmisoras de radiofrecuencia o sistemas de radar, pueden estar expuestas a campos de intensidad relativamente elevada.

Los efectos de las radiaciones de RF sobre el cuerpo humano se deben a tres posibles factores: resonancia, calentamiento y quemaduras o descargas eléctricas.

En la tabla 3 se reflejan las principales fuentes de radiaciones de radiofrecuencia.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Campos magnéticos	Campos eléctricos
Horno de inducción (en sus inmediaciones): 10-1.000 A/m	Antenas de radiofrecuencia móviles: 200-1.500 V/m
Operadores de soldadores PVC: 0,1-1 A/m	Operadores de soldadores de PVC: 20-800 V/m
Antenas de radiofrecuencia de baja potencia: 0,1-1 A/m	Transmisores de televisión: 30-300 V/m
Transmisores de televisión: 0,1-1 A/m	Calentadores de inducción: 2-100 V/m
Torres de televisión (en sus inmediaciones): menos de 0,01 A/m	Torres de televisión (En sus inmediaciones): 1 V/m

Tabla 3: Principales fuentes de radiaciones de radiofrecuencia

La energía electromagnética asociada a los campos de radiofrecuencia es el tipo de energía electromagnética que más ha incrementado su uso en las dos últimas décadas, debido principalmente al desarrollo espectacular de las nuevas comunicaciones, en particular de la telefonía móvil, considerada como una de las innovaciones más significativas de los últimos tiempos; de ahí la creciente preocupación por los posibles efectos nocivos de las, cada vez más numerosas, antenas de telefonía, generadoras de este tipo de campos, así como de los teléfonos móviles en sí.

En efecto, la telefonía móvil, se ha convertido en parte integral de las telecomunicaciones modernas. En algunas áreas geográficas de nuestro planeta,

es la única segura y disponible y, en todas se ha extendido ampliamente, haciéndose su uso muy popular.⁵⁹

El creciente número de estaciones de base, imprescindibles para una telefonía móvil de calidad, y la cantidad, cada vez más elevada, de microteléfonos, ha despertado preocupación acerca de posibles efectos adversos de los campos electromagnéticos generados por estos sistemas sobre la salud (sobre todo si se tiene en cuenta la definición que la OMS da sobre la salud como un estado de bienestar físico, mental y social, y no sólo como ausencia de enfermedad o trastorno⁶⁰).

Si se estima el número de usuarios de teléfonos móviles en la actualidad en unos 200 millones, cabe deducir que incluso pequeños efectos supondrían, a largo plazo, graves consecuencias en la salud y sanidad pública de la mayoría de los países.

El desarrollo del citado sistema de comunicación, requiere de la presencia de un número suficiente de antenas, localizadas en estaciones base (BTS), que conecten los teléfonos o unidades móviles (MS) entre sí, y a éstos con la red de telefonía. Las estaciones base, ya se trate de mástiles ubicados en los tejados de edificios de zonas urbanas o de torres emplazadas en promontorios de zonas más despejadas, poseen un impacto visual importante que hace notar con

⁵⁹ Juutilainen, J. y De Seeze, R., "Biological effects of amplitude-modulated radiofrequency radiation", *Scand. J. Work. Environ. Health*, 24 (4), 1998: 245-254.

⁶⁰ OMS Documentos descriptivos. Nr. 193, 1998; Nr. 205, 1998.

intensidad su presencia a las personas que viven o trabajan en las inmediaciones de dichas zonas. Esto, unido a la reciente aparición de determinadas informaciones de contenido generalmente difuso e incompleto, no hacen sino aumentar la incertidumbre y preocupación del ciudadano medio respecto a este tema.

II.3.1.- Radiaciones de radiofrecuencia de antenas de telefonía: la transmisión de información por medio de ondas electromagnéticas

La comunicación a larga distancia se basa en el hecho de que, mediante el empleo de la técnica adecuada, la señal acústica (voz) puede modular la señal de radiofrecuencia (portadora). Así, cuando usamos un teléfono, las ondas sonoras generadas al hablar, son traducidas a señales eléctricas por medio de un transductor (micrófono). De esta manera, la información puede ser enviada a distancia por el *transmisor* a través de una *vía de transmisión* adecuada. Si la vía de transmisión es una línea, como ocurre en la telefonía convencional, dicha línea actúa como vía de las oscilaciones electromagnéticas, que se propagarán a través de ella. En el extremo de la línea se localiza el punto de destino o *receptor*, donde la información es capturada y demodulada a ondas acústicas mediante otro transductor apropiado (altavoz), lo que permite al destinatario interpretar la información a él dirigida.

La telefonía móvil permite prescindir en parte del uso de las líneas, utilizando la propagación de las ondas electromagnéticas en el espacio libre.

Dado que las señales electromagnéticas viajan a través del aire, desde las antenas emisoras a las receptoras, a la velocidad de la luz, el retardo temporal en la recepción de la información es muy pequeño, por lo que la telefonía móvil capacita al usuario para enviar y recibir información sin apenas limitaciones espaciales.

II.3.1.a.- Las antenas de telefonía móvil

Estas antenas emisoras cumplen la función de emitir al espacio ondas electromagnéticas en el rango de las radiofrecuencias y microondas (genéricamente RF), o de recibir estas señales (antenas receptoras).

Cuando la radiación electromagnética se propaga en el espacio existe una transmisión de potencia que es suministrada por la antena emisora, y captada en parte por la antena receptora. La forma en que tiene lugar la emisión de la señal electromagnética al espacio viene determinada por el tipo de antena empleado y por la frecuencia de la onda emitida.

II.3.1.b.- Las estaciones de telefonía móvil

En un teléfono móvil la vía de transmisión está constituida por la unidad de radio incluida en el teléfono. Es decir, el propio teléfono representa una estación móvil (MS) que contiene todo el equipo técnico requerido por el usuario: un sistema para transducción de voz, una unidad de radio y una antena emisora- receptora.

La estación móvil permite transmitir datos a la estación base transceptora (BTS), que es una unidad estacionaria instalada en una posición óptima dentro del área de cobertura. Incluye antenas emisoras y receptoras con su correspondiente unidad de alimentación y los sistemas necesarios para actuar de enlace entre sus estaciones móviles y la red pública de teléfonos, a través de unidades retransmisoras o repetidoras. En las estaciones base propias de áreas rurales o poco pobladas, las antenas están montadas en mástiles o torres. En áreas urbanas, las antenas se ubican en puntos elevados, generalmente sobre tejados de edificios.

Según el sistema que emplean, las estaciones móviles trabajan en un determinado rango de frecuencias portadoras. Hasta hace poco tiempo cada país europeo empleaba su propio sistema de telefonía, lo que hacía incompatibles los equipos de los diferentes sistemas; ante esta situación, la Confederación Europea de Correos y Telecomunicaciones optó por definir una norma técnica única, que operaría en una banda de frecuencias común y que habría de ser adoptada por todos los países miembros de la Unión Europea. Así surgió el denominado “Global System for Mobile Communications” (GSM), que emplea tecnología digital y que opera en la banda de frecuencias de 900 MHz. Una extensión de este sistema, el “European Digital Cellular System” (DCS- 1800), es muy semejante al GSM, pero opera en la banda de 1800 MHz.⁶¹

⁶¹ Altpeter, E. S. et al., *BEW Publication Series, Study No. 55*, Berne, 1995: 155.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Como se ha descrito en apartados anteriores, los sistemas de telefonía móvil utilizan la transmisión de ondas de radiofrecuencia para permitir la comunicación de sus usuarios desde cualquier lugar, incluso en movimiento. Para satisfacer estas condiciones, los operadores deben desplegar una tupida red de estaciones base que proporcione una cobertura con la calidad adecuada. Esta alta densidad de estaciones base, unido al uso generalizado de terminales portátiles, son el origen del interés del público por los posibles efectos de estas emisiones, tanto sobre la salud como sobre otros sistemas eléctricos con los que pudieran interactuar.

En general, y como también se ha indicado con anterioridad, los efectos nocivos comprobados para exposiciones a radiofrecuencia, están relacionados con la capacidad que poseen estas ondas de inducir corrientes eléctricas en los tejidos expuestos, lo que conduce a una elevación de la temperatura interna del sistema. Si el incremento de la temperatura corporal inducido por la exposición a la radiación no es severo (menor de 1°C), la sangre circulante es capaz, habitualmente, de disipar el exceso moderado de calor.⁶²

Existe un amplio consenso entre los expertos en lo que concierne a los citados efectos térmicos de las radiofrecuencias, en base a una evidencia experimental extensa y robusta. No ocurre lo mismo en el caso de los efectos de tipo no térmico, tema éste en el que domina la controversia sobre posibles efectos perjudiciales para la salud.

⁶² Müller, K. O., Stecher, M., en: EMV- ROHDE&SCHWARZ, GmbH & Co., KG, Febrero, 1995.

II.3.2.- Revisión de bioefectos relevantes para exposiciones a frecuencias de 100 kHz a 300 GHz

II.3.2. a.- Epidemiología del cáncer en humanos

La energía emitida por las **antenas de telefonía móvil** instaladas en postes o en azoteas es relativamente débil, por lo que no cabe esperar que de la exposición a sus emisiones, incluso a pocos metros de distancia, se deriven efectos térmicos nocivos para la salud. Así lo indican también las extrapolaciones de datos experimentales sobre modelos *in vivo* e *in vitro*.⁶³

En realidad, aunque en la actualidad están en curso diversos proyectos, no se dispone de datos epidemiológicos de exposición a RF emitidas por antenas de estaciones base de telefonía, ya que los trabajos presentados sobre esta materia corresponden a estudios realizados sobre muestras de individuos potencialmente expuestos a emisiones de otras fuentes de RF, como son antenas de televisión⁶⁴ o de radar.⁶⁵

⁶³ Como se refleja en la revisión de la materia llevada a cabo por Úbeda, A. y Trillo, M.A., "Radiaciones RF de antenas de telefonía y Salud Pública", *Radioprotección*, VII (29), 1999: 24-36.

⁶⁴ Así, por ejemplo, el trabajo de Hocking, B.; Gordon, I.R.; Grain, H.L. y Hatfield, G.E., "Cancer incidence and mortality and proximity to TV towers", *Med. J. Aust.*, 165(11-12), Diciembre, 1996: 601-605, que describe una alta incidencia de leucemia en adultos y niños en las proximidades de torres de TV, o los estudios de Dolk, H.; Elliott, P.; Shaddick, G.; Walls, P. y Thakrar, B., "Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. I. Sutton Coldfield transmitter, y II. All high power transmitters", *Am. J. Epidemiol.*, 145(1), Enero, 1997: 1-17, quienes, en el primero de sus trabajos, informan de casos de cáncer de piel y leucemia en adultos, en un radio de 2 Km alrededor de torres de FM- TV, frente a ninguna asociación con el cáncer en el segundo trabajo.

⁶⁵ Es el caso del estudio realizado por Szmigielski, S., "Cancer mortality in subjects occupationally exposed to high frequency (Radiofrequency and microwaves) electromagnetic radiation", *Sci. Total Environ.*, 180, 1996: 9-17, o, del mismo autor en: Marino (ed.): *Modern Bioelectricity*. New York: Marcel Dekker, 1998: 861- 925, donde se describen altas tasas de leucemia y linfoma en personal militar expuesto a RF de radares.

Algunos de estos trabajos, que han sido criticados debido a posibles deficiencias metodológicas,⁶⁶ encontraron incidencias elevadas de determinados tipos de cáncer en ciertas áreas próximas a las torres emisoras. Sin embargo, estudios posteriores más amplios no reprodujeron los resultados iniciales.⁶⁷

Respecto al **teléfono móvil**, se ha sugerido que su uso prolongado y frecuente podría provocar dolores de cabeza.⁶⁸ Así, un estudio epidemiológico realizado por Mild y col.,⁶⁹ entre usuarios de teléfonos móviles, indicaba que éstos mostraban una tendencia a declararse aquejados de dolor de cabeza con más frecuencia que los usuarios de teléfonos convencionales. El estudio, sin embargo, no se considera concluyente, debido a limitaciones metodológicas y a supuestas diferencias socioculturales entre las muestras comparadas.

Por otra parte, Leeuwen y col.⁷⁰ han descrito que, en las peores condiciones de uso y con el modelo de teléfono de mayor potencia de emisión, siendo ésta como máximo de 1,6 W/kg, podrían darse, en zonas

⁶⁶ E.C., "Directorate General V", op. cit., 1996 y E.C., "Directorate General XII", op. cit., 1996.

⁶⁷ Como ocurrió con el intento de McKenzie, D.R.; Yin, Y. y Morrell, S. "Childhood incidence of acute lymphoblastic leukaemia and exposure to broadcast radiation in Sydney: a second look", *Aust. N. Z. J. Public Health.*, 22(3 Suppl), 1998: 360-367, de replicar el estudio de Hocking et al. de 1996. Lograron confirmar la alta incidencia de leucemia infantil en un área próxima a las antenas, pero no en otras similares. Las tasas informadas por el equipo de Hocking parecen haber sido sobrevaloradas.

⁶⁸ Frey, A.H., "Headaches from cellular telephones: are they real and what are the implications?", *Environ. Health Perspect.*, 106(3), Marzo, 1998: 101-103.

⁶⁹ Mild et al., Documento del: *National Institute for Working Life* (Sweden), 1998.

⁷⁰ Kotte, A.N.; van-Leeuwen, G.M. y Lagendijk, J.J., "Modelling the thermal impact of a discrete vessel tree", *Phys. Med. Biol.*, 44(1), Enero, 1999: 57-74.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

intracraneales inmediatas a la antena del teléfono, microincrementos de temperatura inferiores o iguales a 0,1°C. Teniendo en cuenta que el tejido nervioso del cerebro, por su necesidad de equilibrio térmico, se encuentra muy vascularizado, se calcula que los hipotéticos incrementos de temperatura, serían disipados inmediatamente por la sangre circulante.

Una publicación reciente de Moulder y colaboradores presenta una revisión crítica de los estudios experimentales y epidemiológicos más relevantes en los últimos años, llegándose en ella a la conclusión de que dichos estudios no sugieren una asociación causal entre cáncer y exposición a las RF, a pesar de ser los estudios escasos y de presentar todos ellos deficiencias en la cuantificación de la exposición.⁷¹

Dos trabajos similares sobre usuarios de teléfonos móviles, presentados en 1999 han sido fuente de controversia por las posibles implicaciones de sus resultados en la etiología del cáncer.⁷²

⁷¹ Moulder, J.E.; Erdreich, L.S.; Malyapa, R.S.; Merritt, J.; Pickard, W.F. y Vijayalaxmi, "Cell phones and cancer: what is the evidence for a connection?", *Radiat. Res.*, 151(5), Mayo, 1999: 513-531.

⁷² El estudio realizado por Muscat (Wireless Technology Research Symposium, Jun. 1999) no detectó incremento de cánceres cerebrales en general, aunque se encontró un riesgo incrementado de tumores en el lado del cerebelo en el que se aplicaba el teléfono móvil. No obstante, el mismo incremento fue detectado en usuarios de teléfonos convencionales. Asimismo, el estudio describe un aumento estadísticamente significativo de tumores neuroepiteliales, pero no se encontró efecto de dosis- respuesta. Por otra parte, Hardell, L.; Nasman, A.; Pahlson, A.; Hallquist, A. y Hansson-Mild, K., "Use of cellular telephones and the risk for brain tumours: A case-control study", *Int. J. Oncol.*, 15(1), Julio, 1999: 113-116, no observaron diferencias en la frecuencia de cánceres cerebrales entre usuarios y no usuarios de teléfonos móviles. Se encontró una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a un exceso en la incidencia de tumores en el lóbulo temporal/ occipital derecho para sujetos que usaban el teléfono con la mano derecha, y en el izquierdo para los zurdos.

No obstante, al valorar la relevancia de los resultados de ambos estudios en su conjunto, es imperativo tener en cuenta que los datos presentan inconsistencias y divergencias, y que no son en absoluto concluyentes: la cuantificación de los niveles de exposición de los sujetos incluidos en estos trabajos fue muy poco precisa, las muestras consideradas eran demasiado pequeñas para resultar representativas y los incrementos relativos de riesgo, no significativos estadísticamente.

Por todo lo expuesto, la evidencia epidemiológica actual indica que la existencia de una posible relación entre exposición a RF y riesgo incrementado de cáncer, no está avalada por datos consistentes.⁷³

II.3.2. b.- *Datos experimentales*

- **Efectos celulares**

Los campos RF afectan a determinadas propiedades de los canales iónicos de la membrana celular, como son la disminución en la formación de los mismos y su frecuencia de apertura. En cuanto al transporte de cationes de sodio y potasio a través de la membrana, los estudios indican que los cambios pueden ocurrir sin producirse alteraciones en la temperatura a frecuencias que oscilan entre 27 MHz y 10 GHz.⁷⁴ A este respecto cabe destacar que, según los datos, es plausible que las RF

⁷³ UNEP/WHO/IRPA 1993.

⁷⁴ Cleary, S.F., "Effects of radio- frequency radiation on mammalian cells and biomolecules *in vitro*", en: Blank, M., ed., *Electromagnetic fields: biological interactions and mechanisms*, Washington: American Chemical Society, 1995: 467- 477.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

faciliten las transiciones de la fase lipídica en la membrana a temperaturas próximas a la fase de transición,⁷⁵ así como que sean capaces de producir alteraciones en la bomba de sodio-potasio.⁷⁶

Asimismo se han descrito por ciertos investigadores, para estudios *in vitro*,⁷⁷ pérdidas de calcio en las terminaciones nerviosas o en células cerebrales, aunque estos resultados no han podido ser replicados por otros laboratorios.

Por otra parte se han descrito efectos, aún sin confirmar, en los transductores de señal (proteínquinasas), cuya activación se puede asociar, en determinados casos como el de la ODC (Ornitina decarboxilasa), con la aparición de agentes promotores de tumores de varios tipos durante la carcinogenesis.⁷⁸

En cuanto a lateraciones celulares proliferativas, varios estudios se han dirigido a determinar si la exposición a RF afecta a las respuestas proliferativas en linfocitos; muchas de estas investigaciones han dado resultados negativos; sin embargo Czerska observó un incremento de la

⁷⁵ Tenforde, T.S. y Liburdy, R. P., "Magnetic deformation of phospholipidic bilayers: effects on liposoma shape and solute permeability at prophase transition temperatures", *J. Theor. Biol.*, 133, 1988: 385- 396.

⁷⁶ Liu, D. S.; Astumian, R.D. y Tsong, T.Y., "Activation of Na⁺ and K⁺ pumping modes of (Na, K)-ATPase by oscillating electric field", *J. Biol. Chem.*, 265, 1990: 7260- 7267.

⁷⁷ Adey, W. R., "Tissue interactions with non- ionizing electromagnetic fields", *Physiol. Rev.*, 61, 1981: 435- 514.

⁷⁸ Byus, C. V.; Kartum, K.; Pieper, S. y Adey, W.R., "Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low- energy modulated microwave fields and phorbol ester tumour promoters", *Cancer Res.*, 48, 1988: 4222- 4226.

activación de linfocitos humanos expuestos a RF de 2450 MHz.⁷⁹

- **Efectos genotóxicos y efectos cancerígenos**

La mayoría de las evidencias experimentales desarrolladas en laboratorio indican que bajos niveles de campos de RF no tienen efectos mutagénicos y ni siquiera actúan como iniciadores de la carcinogenesis.⁸⁰

Se ha realizado un gran número de estudios *in vitro* con el fin de detectar los efectos de la exposición a RF en el ADN y en la estructura de los cromosomas.⁸¹ La mayor parte de estos estudios ha obtenido resultados negativos,⁸² y únicamente han sido positivos cuando, por efecto de los campos magnéticos utilizados, se ha visto incrementada la temperatura del medio de cultivo.⁸³ En algunos casos, los daños sobre el ADN o las estructuras de los cromosomas son atribuibles a factores experimentales

⁷⁹ Czerska, E. M.; Elson, E.C.; Davis, C.C.; Swicord, M.L. y Czerski, "Effects of continuous and pulsed 2450 MHz radiation exposure on spontaneous transformation of human lymphocytes in vitro", *Bioelectromagnetics*, 13, 1992: 247- 259.

⁸⁰ IEEE, 1992; NRPB, 1992; CRIDLAND, 1993; UNEP (WHO/IRPA), 1993; VERSCHAEVE, 1995; EC, 1996.

⁸¹ Como reflejan las distintas revisiones realizadas, entre ellas las de la UNEP/WHO/IRPA, "EMF (300 Hz- 300 GHz)", op. cit., sobre estudios *in vitro*, que recogen resultados negativos en cuanto al daño en ADN o estructuras cromosómicas, excepto para RF capaces de elevar la temperatura del cultivo.

⁸² Así, por citar un ejemplo, el estudio con cultivos de células fibroblásticas sometidas a RF de 2,45 GHz y 1- 12,5 W/kg realizado por Cain, C.D.; Thomas, D.L. y Adey, W.R., "Focus formation of C3H/10T1/2 cells and exposure to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field", *Bioelectromagnetics*, 18(3), 1997: 237-243, en el que no se observaron efectos genotóxicos.

⁸³ Es el caso del trabajo de Scarfi, M.R.; Prisco, F.; Bersani, F.; Lioi, M.B.; Zeni, O.; Di Pietro, R.; Franceschi, C.; Motta, M.; Iafusco, D.y Stoppoloni, G., "Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in lymphocytes from subjects affected by Turner's syndrome", *Mutat. Res.*, 357(1-2), Octubre, 1996: 183-190, que estudia el posible efecto de campos de 90 GHz y 70 W/kg sobre cultivos de leucocitos, y en el que se describe daño genético y potenciación de la genotoxicidad de un cancerígeno químico, ambos fenómenos probablemente debidos a un efecto térmico.

secundarios, como el posible sinergismo con mutágenos químicos o físicos.⁸⁴

En contraste con estas evidencias, algunos estudios en roedores indican que la exposición a RF puede afectar al ADN.⁸⁵ A este respecto cabe destacar los resultados publicados por Repacholi y colaboradores en 1997; este equipo empleó ratones genéticamente proclives al desarrollo de linfomas. Los animales fueron expuestos intermitentemente durante ocho meses a RF intensas de señal modulada, imitando las características de las ondas típicas de la telefonía móvil. Al final del estudio se encontró un incremento modesto, pero estadísticamente significativo, en la frecuencia de linfomas de la muestra expuesta a RF. No obstante, no se encontraron cambios en la frecuencia de otros tipos de cánceres.

El citado trabajo, a pesar de sus potenciales repercusiones, todavía no ha sido replicado independientemente, por lo que no es posible valorar en términos de salud humana la relevancia de los datos descritos.

⁸⁴ Así lo refleja el estudio anteriormente citado de Scarfi et al., "Spontaneous and mitomycin...", op. cit., 183-190, o el de Maes, P; Collier, M.; Slaets, D. y Verscheve, L., "954 MHz microwaves enhance the mutagenic properties of mytociin C", *Environ. Molec. Mutagen.*, 28, 1996: 26-30, sobre cultivos de células sanguíneas humanas sometidas a campos de 954 MHz y 1,5 W/kg, que potencian el daño genético provocado por un cancerígeno químico.

⁸⁵ Existen, al respecto, numerosos estudios con roedores; entre los que describen algún tipo de daño genético están, por citar algunos, el de Sarkar, S.; Ali, S. y Behar, J., "Effect of low power microwave on the mouse genome: A direct DNA analysis", *Mutat. Res.*, 320, 1994: 141-147, que informa de alteraciones del material genético en cerebro y testículos, o los trabajos de Chou, C.K.; Guy, A.W.; Kunz, L.L.; Johnson, R.B.; Crowley, J.J. y Krupp, J.H., "Long-term, low-level microwave irradiation of rats", *Bioelectromagnetics*, 13(6), 1992: 469-496 y Guy, A.W., en: Klauenberg et al., eds.: "RF Radiat Standards", *Biol. Effects, Dosimetry, Epidem. And Public Health*, Plenum Press, NATO ASI Series A, 274, 1994: 311- 326, que describen cómo lesiones malignas aparecen antes y son más frecuentes en ratas sometidas a RF de 2,45 GHz y 0,4 W/kg durante 2- 27 meses de exposición. Si bien, según los propios autores, los resultados pueden no ser de relevancia biológica.

No obstante, otros estudios con roedores (normales, modificados genéticamente siendo proclives a desarrollar distintos tipos de cáncer o tratados con cancerígenos químicos), no describen efectos de tipo cancerígeno para diversas exposiciones a campos de RF.⁸⁶

Para concluir, se puede afirmar en virtud de los datos de que disponemos actualmente que, por debajo de los niveles a los que se dan efectos térmicos, las RF no generan respuestas mutagénicas y no influyen en la iniciación del cáncer.⁸⁷

Los estudios que sugieren una posible acción cancerígena o de influencia en procesos de progresión o promoción tumoral, son considerados demasiado escasos para constituir un bloque de evidencia

⁸⁶ Se pueden citar en este sentido los trabajos de Szmigielski, S.; Szudziński, A.; Pietraszek, A.; Bielec, M.; Janiak, M. y Wrembel, J.K., "Accelerated development of spontaneous and benzo(a)pyrene-induced skin cancer in mice exposed to 2450-MHz microwave radiation", *Bioelectromagnetics*, 3(2), 1982: 179-191; Salford, L.G.; Persson, B.R.; Brun, A.; Ceberg, C.P.; Kongstad, P.C. y Mir, L.M., "A new brain tumour therapy combining bleomycin with in vivo electroporation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194(2), Julio, 1993: 938-943; Liddle, C.G.; Putnam, J.P. y Huey, O.P., "Alteration of life span of mice chronically exposed to 2.45 GHz CW microwaves", *Bioelectromagnetics*, 15(3), 1994: 177-181; Wu, R.Y.; Chiang, H.; Shao, B.J.; Li, N.G. y Fu, Y.D., "Effects of 2.45-GHz microwave radiation and phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice", *Bioelectromagnetics*, 15(6), 1994: 531-538; Toler, J.C.; Shelton, W.W.; Frei, M.R.; Merritt, J.H. y Stedham, M.A., "Long-term, low-level exposure of mice prone to mammary tumours to 435 MHz radiofrequency radiation", *Radiat. Res.*, 148(3), Septiembre, 1997: 227-234; Frei, M.R.; Jauchem, J.R.; Dusch, S.J.; Merritt, J.H.; Berger, R.E. y Stedham, M.A., "Chronic, low-level (1.0 W/kg) exposure of mice prone to mammary cancer to 2450 MHz microwaves", *Radiat. Res.*, 150(5), Noviembre, 1998: 568-576; Imaida, K.; Taki, M.; Yamaguchi, T.; Ito, T.; Watanabe, S.; Wake, K.; Aimoto, A.; Kamimura, Y.; Ito, N. y Shirai, T., "Lack of promoting effects of the electromagnetic near-field used for cellular phones (929.2 MHz) on rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay", *Carcinogenesis*, 19(2), Febrero, 1998: 311-314; Imaida, K.; Taki, M.; Watanabe, S.; Kamimura, Y.; Ito, T.; Yamaguchi, T.; Ito, N. y Shirai, T., "The 1.5 GHz electromagnetic near-field used for cellular phones does not promote rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay", *Jpn. J. Cancer Res.*, 89(10), Octubre, 1998: 995-1002.

⁸⁷ Wu et al., op. cit., 531; Toler et al., op. cit., 227; Frei et al., op. cit., 568; Imaida et al., op. cit., 311; Salford et al., op. cit., 938.

firme, aunque sí son suficientes para aconsejar la realización de nuevos estudios, de acuerdo con las recomendaciones de la OMS.⁸⁸

- **Estudios sobre el sistema inmune**

Dado que el sistema inmune es el encargado de defender al organismo frente a las agresiones procedentes del exterior, se ha estudiado su reacción ante la exposición a ondas de radiofrecuencia.⁸⁹

Pocos efectos biológicos significativos han sido identificados en experimentos *in vitro*; sin embargo sí se han hallado alteraciones en el comportamiento de los linfocitos, como ya se ha señalado con anterioridad,⁹⁰ así como en la actividad de la kinasa linfocitaria,⁹¹ a partir de la acción de campos de RF modulados. Debido a que el sistema inmune es complejo y presenta una gran variedad de modelos biológicos y de sistemas de exposición, los resultados son todavía bastante inconsistentes.

- **Los efectos sobre el sistema nervioso**

Pocos estudios de los realizados hasta el presente han mostrado indicios de posibles efectos no térmicos a nivel del sistema nervioso.⁹² En general,

⁸⁸ Repacholi, M.H., "Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs", *Bioelectromagnetics*, 19(1), 1998: 1-19.

⁸⁹ UNEP/WHO/IRPA, 1993; Polson and Heynick, 1994; EC, 1996.

⁹⁰ Lyle, D.B.; Scheter, P.; Adey, W.R. y Lundak, R.L., "Supresión of T- lymphocyte cytotoxicity following exposure to sinusoidal amplitude modulated fields", *Bioelectromagnetics*, 4, 1983: 281-292.

⁹¹ Como describe el equipo de Byus, C.V.; Lundak, R.L.; Fletcher, R.M. y Adey, W.R., "Alterations in kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields", *Bioelectromagnetics*, 5, 1984: 341-351.

⁹² Así lo indica la revisión de estudios *in vivo* realizada por la UNEP/WHO/IRPA, 1993, op. cit.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

las consecuencias que los efectos observados pudieran tener sobre la salud (cambios en la actividad colinérgica de animales,⁹³ que podrían influir en el aprendizaje y la memoria en ratas, o variaciones en el electroencefalograma⁹⁴), no pueden ser determinadas hasta que los resultados sean replicados y las investigaciones ampliadas para proporcionar datos más completos, aunque sí cabe apuntar la relación que exposiciones a RF podrían tener con ciertas patologías estrechamente relacionadas con la actividad eléctrica cerebral, como la epilepsia. Se ha postulado que pequeñas inducciones eléctricas pudieran tener el efecto desencadenante de una crisis ictal.

En cuanto a los estudios sobre la barrera hematoencefálica, no se han conseguido establecer los cambios de permeabilidad real a bajos niveles de exposición, aunque los primeros estudios realizados al respecto informan sobre un aumento de la permeabilidad como efecto térmico de la exposición a RF.⁹⁵ En estudios más recientes, se ha comprobado un

⁹³ Como describen sucesivos trabajos de Lai, H.; Horita, A. y Guy, A.W., "Acute low-level microwave exposure and central cholinergic activity: studies on irradiation parameters", *Bioelectromagnetics*, 9(4), 1988: 355-362; "Low-level microwave irradiation and central cholinergic activity: a dose-response study", *Bioelectromagnetics*, 10(2), 1989: 203-208, y "Microwave irradiation affects radial arm maze performance in the rat", *Bioelectromagnetics*, 15, 1994: 95-104.

⁹⁴ Chizhenkova, R.A. y Safroskina, A.A., "Electrical reactions...", op. cit., 253-258, presentaron cambios en los patrones de EEG de conejos no anestesiados expuestos a 800 MHz y 40 mW/cm² durante un minuto, resultando sorprendente el que estos cambios se mantuvieran tras la exposición, probablemente por el efecto de inducción de área. Los mismos resultados, aunque con diferentes tratamientos, obtienen los trabajos de Pu, J.S et al., "The effects of 3000 MHz...", op. cit., 243-247, y Vorobyov, V.V. et al., "Effects of weak microwave...", op. cit., 293-298.

⁹⁵ UNEP/WHO/IRPA, 1993, EC, 1996.

aumento de la permeabilidad ante la exposición a RF con SAR de 0,016 W/kg y superiores.⁹⁶

En general, y para concluir, en los trabajos experimentales se han empleado intensidades de exposición muy por encima de los límites de seguridad establecidos por las normativas internacionales.

Por otra parte, existe una serie de estudios recogidos en la Europa del Este, acerca de ciertos síntomas cuyo conjunto se ha venido a denominar “microwave sickness” (MWS), y que incluye fatiga, dolores de cabeza y disaestesia, así como otros efectos que implican el sistema nervioso, observados en trabajadores expuestos a emisiones de RF. A pesar del escepticismo con que el supuesto síndrome fue acogido en un principio por los países de Europa Occidental, hay expertos que consideran que el síndrome de MWS podría constituir una verdadera entidad médica que debería ser reconocida como posible factor de riesgo para la salud de los trabajadores expuestos a RF.⁹⁷

Ninguno de los estudios mencionados ha sido replicado independientemente, en algunos casos porque todavía no se ha realizado un intento de réplica, en otros porque el intento ha generado resultados negativos.

⁹⁶ Salford, L.G. et al., “Permeability of the blood-brain barrier ...”, op. cit., 535-542; Neubauer, C. et al., “Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz...”, op. cit., 261-268.

⁹⁷ Hocking, B., “Microwave sickness: a reappraisal”, *Occup. Med. Oxford*, 51(1), Febrero, 2001: 66-69.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

En estas condiciones, la opinión general entre los especialistas es la de que, actualmente, no existe evidencia firme de efectos nocivos para la salud derivados de exposiciones a RF en niveles inferiores a los límites vigentes. No obstante, se poseen indicios, limitados pero repetidos, de posibles efectos no térmicos de las RF, que hacen aconsejable la ampliación y profundización en la investigación de los mecanismos biológicos y biofísicos de respuesta a estas radiaciones no ionizantes.

II.4.- UNIDADES Y DOSIMETRÍA. NORMATIVA

Como se ha podido comprobar a lo largo de nuestra exposición, las unidades que se barajan a la hora de determinar campos electromagnéticos son varias y se refieren a diferentes conceptos. Así, la intensidad de campo eléctrico, magnitud vectorial (E) que corresponde a la fuerza ejercida sobre una partícula cargada, independientemente de su movimiento en el espacio, se expresa en voltios por metro (V/m).

A su vez, el campo magnético se suele medir en términos de densidad de flujo magnético o inducción magnética. Se representa como una magnitud vectorial (B) que da lugar a una fuerza que actúa sobre las cargas en movimiento y se mide en Teslas (T),⁹⁸ aunque también son utilizadas otras unidades, como el Gauss (G), a pesar de no pertenecer ésta al Sistema Internacional.

Es importante señalar aquí que el campo magnético terrestre tiene una intensidad de 0,5 G, que corresponden a 50 μ T. Por otra parte, es empleada asimismo otra unidad, el Oersted (Oe)⁹⁹, que corresponde a 1G.

$$1 \text{ G} = 1 \text{ Oe} = 100 \mu\text{T}$$

⁹⁸ Tesla fue un físico croata (1857-1943) que emitió la unidad de intensidad de campo magnético; en su honor, dicha unidad se denominó *Tesla*.

⁹⁹ Unidad que debe su nombre al físico y químico danés Christian Oersted, (1777-1851), que realizó el experimento que lleva su nombre y consiste en una desviación de la orientación de la aguja imanada al colocar en sus proximidades un conductor por el que circula corriente eléctrica. $1\text{Oe}=10^3/4\pi\text{A.m}^{-1}$.

La dosimetría es uno de los elementos fundamentales para cualquier estudio científico. En 1985, la FCC (Comisión Federal de Comunicaciones, EEUU) adoptó por primera vez una guía para evaluar la exposición humana a emisiones de RF,¹⁰⁰ que fue revisada en 1996 como resultado de un proceso comenzado tres años antes para emisiones que utilizaran frecuencias entre 100 KHz y 300 GHz. Los límites de exposición máxima permisible (MPE) fueron los recomendados por el NCRP (National Council on Radiation Protection and Measurements, 1996).

Los límites pueden venir expresados en dos tipos de unidades: cuando interesa describir la potencia de la radiación en el aire, sin atender a su interacción con un cuerpo expuesto a la señal, se emplea la densidad de potencia (S), definida como potencia por unidad de superficie perpendicular a la dirección de propagación de la onda electromagnética, y que viene dada en vatios por metro cuadrado (W/m^2) o en milivatios por centímetro cuadrado (mW/cm^2). Si, por el contrario, el interés de la medida radica en valorar la forma en que la energía de una radiación es absorbida por un cuerpo dado, se calcula la tasa o coeficiente de absorción específica (SAR: Specific Absorption Rate), que es la derivada en el tiempo del incremento de energía (dW) absorbida por una masa diferencial (dm) contenida en un volumen diferencial (dV), y que tiene una determinada densidad. Se expresa en vatios por kilogramo de masa (W/kg).

¹⁰⁰ ANSI, FCC, 1985.

El parámetro generalmente aceptado a la hora de determinar dosis de radiación es, pues, el denominado SAR, o coeficiente de absorción específica en una masa tisular determinada, aunque algunos consideran que el SAR no es un parámetro aplicable a campos de RF de bajo nivel. La determinación del SAR en los campos electromagnéticos es una función complicada, dependiente de varios parámetros de exposición, como son el valor de la densidad de corriente inducida por la radiación en el tejido (A/m^2) y las propiedades físicas del tejido biológico en cuestión: densidad (kg/m^3) y conductividad (en S/m).¹⁰¹ Cabe destacar, asimismo, que en algunos estudios *in vivo* e *in vitro*, la polarización del campo eléctrico puede ser un importante parámetro de exposición en las estructuras celulares.

Uno de los principales problemas a la hora de comparar los resultados de los diferentes estudios realizados en este campo, es precisamente la ausencia de acuerdos acerca de las referencias dosimétricas.¹⁰² A este respecto, las definiciones dosimétricas de campo próximo y campo lejano, desarrolladas por la UNEP/WHO/IRPA (1993), constituyen un elemento básico para establecer efectos de radiaciones de CEM.¹⁰³ Los campos cercanos no son medidos

¹⁰¹ Véanse al respecto los trabajos de Chou, C.K.; Bassen, H.; Osepchuk, J.; Balzano, Q.; Petersen, R.; Meltz, M.; Cleveland, R.; Lin, J.C. y Heynick, L., "Radio frequency electromagnetic exposure: tutorial review on experimental dosimetry", *Bioelectromagnetics*, 17(3), 1996: 195-208, o Rothman, K.J.; Chou, C.K.; Morgan, R.; Balzano, Q.; Guy, A.W.; Funch, D.P.; Preston-Martin, S.; Mandel, J.; Steffens, R. y Carlo, G., "Assessment of cellular telephone and other radio frequency exposure for epidemiological research", *Epidemiology*, 7(3), Mayo, 1996: 291-298.

¹⁰² Ha aparecido recientemente un trabajo que propone un modelo de presentación de datos epidemiológicos para el caso de estudios de efectos de CEM y leucemia infantil, debido a Greenland, S., "Estimation of population attributable fractions from fitted incidence ratios and exposure survey data, with an application to electromagnetic fields and childhood leukaemia", *Biometrics*, 57(1), Marzo, 2001: 182-188.

¹⁰³ Así, para muchas aplicaciones, las medidas de campo lejano son suficientes a la hora de determinar la absorción de RF, aunque en la mayoría de los casos, es necesario desarrollar sofisticados sistemas a fin de lograr monitorizar, por ejemplo, los campos de ELF.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

generalmente durante los estudios epidemiológicos, calculándose la medida de exposición en base a la contestación de cuestionarios, hecho que no garantiza la precisión deseable en los resultados así obtenidos.¹⁰⁴

En resumen: la densidad de corriente es la cantidad dosimétrica básica para campos con frecuencias inferiores a 1MHz, aproximadamente, medida en amperios por metro cuadrado (A/m^2). La cantidad dosimétrica básica para campos de radiofrecuencias de 1 MHz a 10 GHz, es el coeficiente de absorción específica, SAR (W/kg). Para radiofrecuencias superiores a los 10 GHz la unidad dosimétrica básica es la densidad de potencia en vatios por metro cuadrado (W/m^2). (Véase tabla 4).

	CANTIDAD DOSIMÉTRICA BÁSICA	UNIDADES
Menos de 1 MHz	Densidad de corriente	A/m^2
De 1 MHz a 10 GHz	SAR	W/kg
Más de 10GHz	Intensidad de campo	W/m^2

Tabla 4: Cantidades dosimétricas básicas para RNI.

En cuanto a la normativa existente, señalar en primer lugar que ningún país ni organismo científico ha establecido límites para la exposición a campos electromagnéticos con el fin de prevenir enfermedades. Toda la normativa actual

¹⁰⁴ Funch, D.P.; Rothman, K.J.; Loughlin, J.E. y Dreyer, N.A., "Utility of telephone company records for epidemiologic studies of cellular telephones" *Epidemiology*, 7(3), Mayo, 1996: 299-302.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

se basa en unos de estos tres criterios (además, evidentemente, de la observancia del principio de precaución) :

- Prevenir los efectos agudos a corto plazo.
- Mantener el *statu quo* (es decir, que las nuevas instalaciones y equipos no generen valores de campo superiores a los ya existentes).
- Establecer distancias mínimas a edificaciones o lugares accesibles.

Normativa internacional y nacional

La normativa internacional más exigente y comúnmente aceptada, como se ha expuesto con anterioridad, es la promulgada por la Comisión Internacional para la Protección contra la Radiación No Ionizante (ICNIRP, *International Commission for Non Ionizing Radiation Protection*) en 1998. ICNIRP es un organismo científico vinculado a la Organización Mundial de la Salud (OMS), creado en 1992 con el objetivo de investigar los riesgos que pudieran resultar de la exposición a este tipo de radiaciones electromagnéticas y desarrollar, en consecuencia, técnicas de protección. Esta comisión publicó sus conclusiones en 1998. Un año después, el Consejo de la Unión Europea (CUE) hizo suyos los criterios y conclusiones de la ICNIRP y promulgó un conjunto de Recomendaciones para la protección del público en general (no aplicables a los trabajadores) ante eventuales efectos nocivos de la exposición a campos magnéticos no ionizantes. España, al igual que la mayor parte de los países europeos, firmó el paquete de Recomendaciones, que hoy se encuentra vigente

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

en todo el territorio español.¹⁰⁵

En su guía de 1998, ICNIRP llegó a la conclusión, después de examinar toda la literatura científica, de que los únicos efectos nocivos conocidos y comprobados de los campos eléctricos y magnéticos de frecuencia industrial son los efectos a corto plazo (agudos), producidos al superar la densidad de corriente que estos campos inducen en el interior del organismo, cierto valor umbral. Estos efectos se resumen en la tabla 5.

DENSIDAD DE CORRIENTE INDUCIDA	EFFECTOS BIOLÓGICOS
< 1 mA/m ²	No hay efectos biológicos.
1-10 mA/m ²	Efectos biológicos mínimos, no significativos.
10-100 mA/m ²	Posibles efectos sobre el sistema visual (fosfenos) y el sistema nervioso (pequeñas contracciones musculares), sin riesgos para la salud.
100-1.000 mA/m ²	Estimulación de tejidos excitables, por ejemplo nervios o músculos (contracciones musculares y arritmias), con posibles riesgos para la salud.
> 1.000 mA/m ²	Posibles extrasístoles y fibrilación ventricular, con riesgos comprobados para la salud.

Tabla 5: Efectos nocivos conocidos y comprobados de los campos eléctricos y magnéticos de frecuencia industrial

La densidad de corriente endógena en el organismo humano (producida por la actividad eléctrica natural en su interior) se estima en alrededor de 10 mA/m², aunque puede ser muy superior en zonas determinadas; por ejemplo, una

¹⁰⁵ Recomendación del Consejo, de 12 de Junio de 1999 relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos (0 Hz a 300 GHz), Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L199, Julio, 1999: 59-70. (Documento incluido en el Anexo II de la presente tesis doctoral).

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

contracción ventricular del corazón puede alcanzar 1.400 μT , y en algunas situaciones se puede llegar incluso a las 10.000 μT .

Así pues, la restricción básica establecida por ICNIRP para los campos eléctricos y magnéticos de baja frecuencia consiste en mantener en todo momento la densidad de corriente inducida por debajo de 10 mA/m^2 . Además, introduce un factor de seguridad adicional de 5 para el público en general respecto a los trabajadores, ya que en el público puede haber individuos especialmente sensibles por alguna razón (niños, ancianos, enfermos) y que estén expuestos a valores de campo elevados durante mucho más tiempo (exposición residencial frente a la exposición laboral); por consiguiente, se establece que la densidad de corriente inducida para el público no debe superar los 2 mA/m^2 .

El inconveniente de este parámetro es que no se puede medir directamente, por lo que hay que realizar determinados cálculos para relacionarlo con otros parámetros mensurables, como la intensidad de campo. Para ello se aplica un modelo matemático que tenga en cuenta, tanto las propiedades eléctricas del organismo expuesto (conductividad y permitividad), como las condiciones de la exposición (tamaño, forma y posición del organismo), promediándose posteriormente en una región específica del cuerpo.

Con estas condiciones, la guía de ICNIRP establece los valores de referencia para la exposición a campos eléctricos y magnéticos de 50 Hz reflejados en la tabla 6.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Guía ICNIRP	Público	Trabajadores
Campo eléctrico	5 kV/m	10 kV/m
Campo magnético	100 μ T	500 μ T

Tabla 6: Valores límite de referencia para exposición a CEM de 50 Hz (según ICNIRP).

En Julio de 1999, como se ha señalado previamente, el Consejo de la Unión Europea, de acuerdo con su Comité Científico Director, publicó en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas la citada Recomendación, a fin de limitar la exposición del público en general a campos electromagnéticos (de 0 Hz a 300 GHz). Esta Recomendación se basa en gran medida en la guía de ICNIRP, siendo uno de sus objetivos el de homogeneizar la dispersa normativa sobre campos electromagnéticos de cada uno de los países de la Unión Europea. Básicamente, recomienda que el público no esté expuesto a campos eléctricos y magnéticos de 50 Hz superiores a 5 kV/m y 100 μ T, respectivamente, en zonas en las que permanezca mucho tiempo.

Otra iniciativa internacional destacable es la del Parlamento Europeo, que en 1994 emitió la Resolución A3-0238/94 sobre la lucha contra los efectos nocivos provocados por las radiaciones no ionizantes. En ella se hacía eco del gran incremento de todo tipo de radiaciones electromagnéticas artificiales en el medio ambiente, señalando que, a pesar de no estar demostrada su peligrosidad para la salud, recomendaba seguir investigando.¹⁰⁶ En lo relativo a las líneas de

¹⁰⁶ World Health Organization, "Non ionising Radiation ...", op. cit., 30.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

transporte de energía eléctrica de muy alta tensión, la Resolución pedía que cada estado dispusiera “pasillos” a su alrededor, en los que se impida cualquier actividad permanente o edificación, pero sin dar valores ni indicar a partir de qué distancia se permitiría la edificación. Esta Resolución no ha sido traspuesta a la Directiva Comunitaria, ni tampoco adoptada por ningún país miembro.

Italia es el único país del mundo cuya legislación, respondiendo a presiones de sindicatos, grupos ecologistas y parte de la opinión social, impone unas distancias mínimas entre edificaciones y líneas eléctricas de alta tensión para limitar la exposición a los campos eléctricos y magnéticos, aunque data de 1992 (antes de que se aprobara la Resolución del Parlamento Europeo). Estas distancias mínimas son:

- 10 metros a las líneas de 132 kV.
- 18 metros a las líneas de 220 kV.
- 28 metros a las líneas de 400 kV.

Posteriormente, en algunas regiones, se han aplicado límites de exposición a CEM de ELF y RF de radio, televisión, telefonía móvil o radares. Las restricciones italianas se aplican a exposiciones en viviendas, escuelas, hospitales y cualquier otro lugar donde las personas permanezcan regularmente durante cuatro horas o más. No se aplican a teléfonos móviles, dado que, en ese caso, se trata de exposiciones voluntarias.¹⁰⁷

¹⁰⁷ Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana, 3 de Noviembre de 1998.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

En cuanto a Suiza, este país posee, desde Febrero de 2000 un reglamento mucho más restrictivo, en algunos aspectos, que la Recomendación europea. Los límites son aproximadamente unas cien veces más bajos que los recomendados por ICNIRP/CUE. Se trata de límites que se apoyan en la interpretación que las autoridades suizas hacen del llamado “principio de precaución”, y se basan en lo que los expertos convocados por dichas autoridades consideran “indicaciones verosímiles” de que exposiciones crónicas a RNI de bajo nivel pueden ser nocivas. El objetivo perseguido es “mantener las exposiciones tan bajas como resulte técnicamente posible y económicamente sostenible”. Las posiciones de Suiza e Italia han recibido críticas por parte de asociaciones de expertos y de organismos internacionales que entienden en materia de radioprotección, incluida la OMS. Las críticas se centran en la idea de que estas normativas restrictivas, que dan prioridad a criterios políticos, dañan gravemente la estrategia de la OMS, que hasta el presente había conducido a un principio de consenso para la normalización de los niveles de seguridad ante exposiciones a radiaciones no ionizantes”.¹⁰⁸

Hay que destacar, asimismo, que diversos países occidentales, entre los que se encuentran Suecia y el resto de los países nórdicos (Dinamarca, Finlandia y Noruega), así como Francia, Irlanda Portugal, Nueva Zelanda, Canadá, etc. no han promulgado ningún tipo de normativa para limitar la exposición a campos eléctricos y magnéticos de frecuencia industrial, a pesar de que a veces se dice que sí lo han hecho.

¹⁰⁸ WHO, *Ordinance on Non- Ionizing Radiation Protection*, 1 de Febrero de 2000.

Por último, la Unión Europea está trabajando actualmente en la elaboración de una propuesta de Directiva sobre "Disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de agentes físicos", destinada a mejorar la protección de los trabajadores frente al ruido audible, vibraciones mecánicas, radiación óptica y campos electromagnéticos.

Cabe señalar que, en el tiempo de redacción de la presente tesis doctoral, la preocupación por los efectos que los campos electromagnéticos puedan tener sobre la salud humana ha ido en aumento, sobre todo en lo que respecta a las antenas de telefonía móvil, hasta el punto de alcanzar instancias públicas; de esta manera el 28 de Septiembre, se dictó el Real Decreto 1066/2001 del Ministerio de la Presidencia, por el que se aprueba el Reglamento que establece condiciones de protección del dominio público radioeléctrico, restricciones a las emisiones radioeléctricas y medidas de protección sanitaria frente a emisiones radioeléctricas. (BOE núm. 234, 29 de Septiembre de 2001). En palabras del propio decreto, éste "cumple con las propuestas contenidas en las mociones del Congreso de los Diputados y del Senado, que instaron al Gobierno a desarrollar una regulación relativa a la exposición del público en general a las emisiones radioeléctricas de las antenas de telefonía móvil. [...] El presente Real Decreto asume los criterios de protección sanitaria frente a campos electromagnéticos procedentes de emisiones radioeléctricas establecidos en la Recomendación del Consejo de Ministros de Sanidad de la Unión Europea, de 12 de Julio de 1999, relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos".

II. 5.- FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LA PARTE EXPERIMENTAL. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (BHE)

La barrera hematoencefálica es un complejo neurovascular que actúa como un filtro capaz de regular el paso selectivo de moléculas desde la sangre hacia el cerebro. Es, por tanto, la encargada de mantener el medio fisiológico entre ciertos límites esenciales para la vida, o lo que es lo mismo, asegura el equilibrio fisiológico del medio en que ha de funcionar el cerebro.

Fue el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich quien, a finales del siglo XIX, observó por primera vez que, tras administración intravenosa, algunos colorantes difundían, tiñendo todos los órganos excepto el cerebro. Este hecho fue interpretado por el citado investigador como una falta de apetencia del tejido cerebral por los colorantes.

En 1913 un discípulo suyo, Edwin E. Goldman, inyectó azul tripán en los ventrículos cerebrales de conejos y perros, constatando la tinción del cerebro y echando así por tierra la interpretación del hecho formulada por Ehrlich. Este descubrimiento puso de manifiesto la existencia de algún tipo de barrera que impedía el paso del colorante desde la sangre al sistema nervioso central (SNC): se trataba de la barrera hematoencefálica.

La existencia de la barrera hematoencefálica cobra sentido si pensamos en el mecanismo de acción del impulso nervioso; de hecho, de todos es sabido

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

que la difusión del impulso eléctrico en la neurona depende de un desequilibrio iónico a ambos lados de su membrana plasmática, así como que la transmisión de este impulso de una neurona a otra se realiza mediante productos químicos sencillos (adrenalina, noradrenalina, etc.), con los que fácilmente podrían competir los compuestos circulantes en sangre. Es por tanto imprescindible para el correcto funcionamiento del sistema nervioso -y con él, del organismo todo-, tanto en la generación como en la transmisión del impulso, que exista algún tipo de barrera selectiva capaz de impedir el paso de las numerosas sustancias circulantes en sangre que podrían alterar el funcionamiento neuronal.

La localización de esta barrera no ha sido fácil y aún es mucho lo que se ignora de ella. En un principio se pensó que el forro astrocitario de los capilares del SNC, formado por los pies perivascuales de los astrocitos (o "pies chupadores"), sería el responsable de ejercer las funciones de barrera hacia el cerebro pero, dado que existen amplias zonas donde este "forro" no existe, esta hipótesis no parecía válida. Por otra parte, la deshidratación del SNC ocasionada por la técnica de preparación del tejido para microscopía electrónica hizo pensar, hasta hace poco tiempo, que el espacio intercelular en el SNC era prácticamente inexistente, y que ello podía explicar su impermeabilidad a determinadas sustancias. En la actualidad se sabe que el espacio intercelular del sistema nervioso central no sólo existe, sino que ha sido cuantificado por técnicas de dilución isotópica, resultando ser de un 15-20%, de manera que la teoría de la impermeabilidad debida a la falta de espacio intercelular resulta hace tiempo inadmisibile.

Los conocimientos que, a fecha de hoy, se tienen sobre la barrera hematoencefálica, se han obtenido mediante estudios cinéticos del paso de sustancias marcadas radiactivamente, o de otras que resultan fácilmente detectables utilizando reacciones enzimáticas como, por ejemplo, la peroxidasa de rábano que, inyectada en el líquido cefalorraquídeo, difunde hasta la célula endotelial, aunque sin alcanzar nunca los vasos sanguíneos.¹⁰⁹

En base a estos estudios se ha podido llegar a establecer que la BHE se encuentra precisamente en las células endoteliales de los capilares, no existiendo, por tanto, en zonas del sistema nervioso central en las que dichas células no se hallan presentes, como son la *neurohipófisis*, *infundíbulo* y *glándula pineal*, de función endocrina; *área postrema*, zona gatillo del vómito, y *región preóptica* y *perirrinal*, áreas quimiorreceptoras sensibles a la angiotensina ante el estímulo de la sed.

La microscopía electrónica ha revelado que las células endoteliales de los capilares cerebrales, a diferencia de las de otras regiones del cuerpo, están unidas entre sí por *Gap* y *tight junctions*¹¹⁰ correspondientes, desde el punto de vista fisiológico, a poros de 15-20 nm (en el caso de los Gap) y 1,5 nm (en el

¹⁰⁹ Sobre los mecanismos de barrera en el cerebro, cabe citar los trabajos de Saunders, N.R.; Habgood, M.D. y Dziegielewska, K.M., "Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26(1), Enero, 1999: 11-19, y "Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain", en la misma publicación, 26(2), Febrero, 1999: 85-91, tanto acerca de cerebro adulto como de fetos y neonatos.

¹¹⁰ Es interesante, referente a la biología celular de la BHE, la revisión llevada a cabo por Rubin, L.L. y Staddon, J.M., "The cell biology of the blood-brain barrier", *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, 1999: 11-28, que se centra en el análisis biológico de las células endoteliales de los capilares cerebrales, enfatizando en la regulación de las uniones intercelulares especializadas.

caso de las tight junctions). Las vesículas de pinocitosis en estas células sólo se observan en condiciones patológicas (como en las del shock endotóxico o la hipoxia) a diferencia de lo que ocurre en otras partes del organismo donde este tipo de vesículas es muy abundante.

Además, las mitocondrias en las células endoteliales de los capilares cerebrales son de cinco a siete veces más numerosas que en los capilares musculares, y su dotación enzimática, junto con la distribución de dichos enzimas en la membrana plasmática, confiere a las células endoteliales cerebrales unas características especiales que las capacitan para ejercer la imprescindible función de barrera selectiva en el paso de sustancias al cerebro.¹¹¹

II.5.1.- Base morfológica de la barrera hematoencefálica

Como ya se ha indicado, la base estructural de la barrera hematoencefálica está constituida por la peculiar morfología del capilar sanguíneo (cuya representación gráfica viene reflejada en la figura 3).

¹¹¹ Esta función, efectivamente imprescindible para el correcto funcionamiento del SNC en condiciones normales supone, no obstante, una importante limitación a la hora de aplicar tratamientos eficaces en las numerosas enfermedades cerebrales existentes, ya que la BHE impide la entrada de muchos de los fármacos prescritos a concentraciones terapéuticas. Esto explica el interés que revisten todas las investigaciones relacionadas con la permeabilidad de esta barrera en la liberación directa de agentes terapéuticos en el cerebro. Así existen numerosos trabajos sobre la manipulación de la permeabilidad de la barrera y sobre cómo eludirla con fines médicos, como demuestra la revisión realizada por Kroll, R.A. y Neuwelt, E.A., "Outwitting the blood- brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means", *Neurosurgery*, 42(5), Mayo, 1998: 1083-1100, acerca de aspectos históricos y avances recientes en los mecanismos de liberación de agentes terapéuticos a través de la BHE para el tratamiento de tumores intracerebrales y otras enfermedades neurológicas.

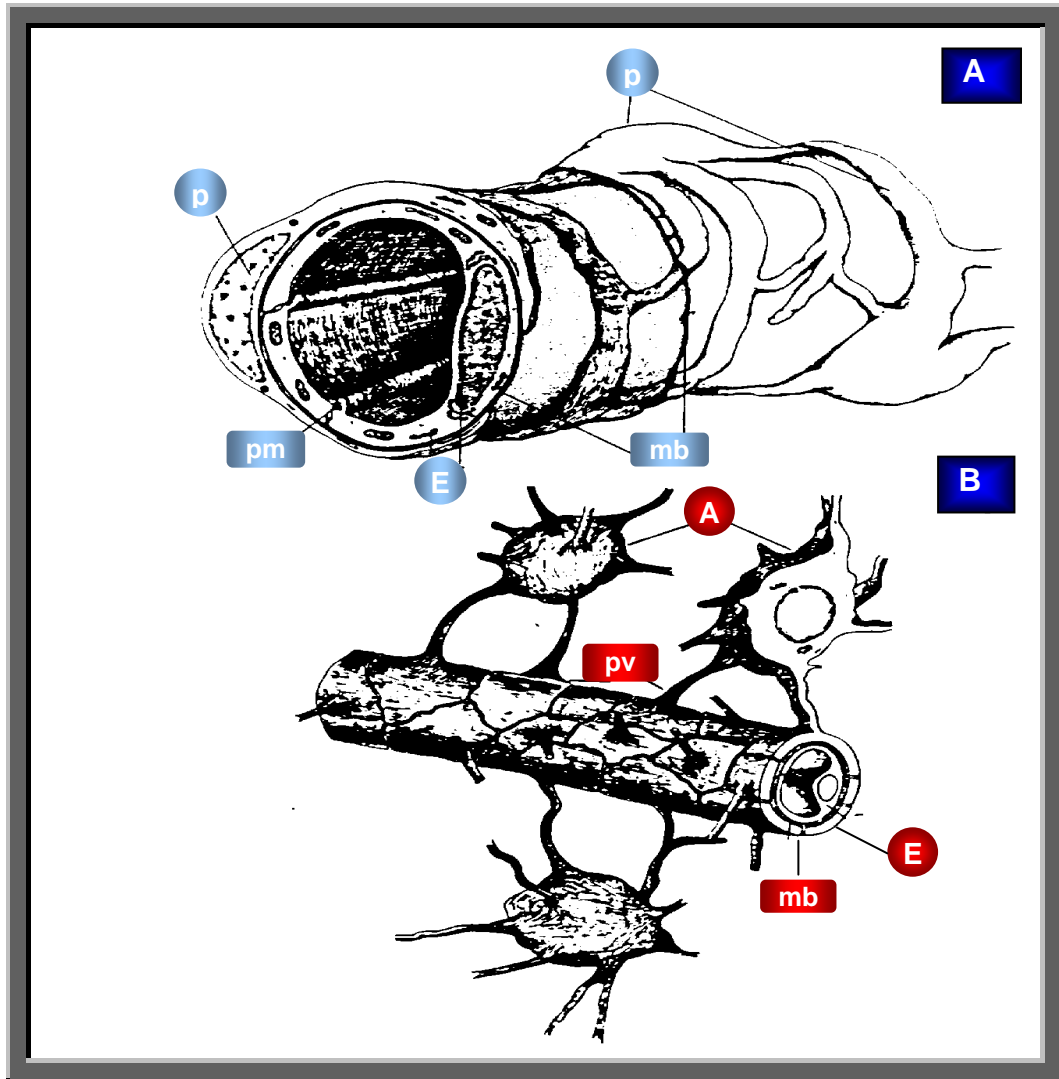


Fig.3: Base morfológica de la barrera hematoencefálica:

A/ Esquema tridimensional de un capilar cerebral: E: endotelio; P: pericito; mb: membrana basal; pm: pliegue marginal de la célula endotelial.

B/ Disposición de los astrocitos perivasculariales: A: astrocitos; E: endotelio; mb: membrana basal; pv: pies perivasculariales. (Según Lafarga y Berciano).

La pared de estos capilares está formada por:

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

- a) Un revestimiento endotelial continuo que consta de *células endoteliales*, las cuales, a diferencia de lo que ocurre en otros territorios capilares, están íntimamente adosadas sin dejar espacios intercelulares.
- b) Entre una y otra célula existen las denominadas *zónulas occludens*, formando bandas capaces de cerrar herméticamente el espacio intercelular.
- c) Una capa discontinua de *pericitos*, células en forma de araña cuyas prolongaciones citoplasmáticas siguen un curso circunferencial.
- d) Terminaciones aplanadas de las prolongaciones citoplasmáticas de la *glía perivascular*, que se yuxtaponen como las piezas de un mosaico para formar la envoltura glial perivascular, que cubre el 85 % de la superficie capilar.¹¹²

Algunos núcleos cerebrales, como ya se ha indicado, carecen de BHE, al no presentar sus capilares esta peculiar estructura de la pared. Constituyen, por tanto, zonas de más fácil penetración para los fármacos. Dichas zonas son: *eminencia media, área postrema, órgano subfomical, glándula pineal y órgano subcomisural*.

¹¹² En el trabajo de Sedlakova, R.; Shivers, R.R. y Del Maestro, R.F., "Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit", *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 31(1), Enero, 1999: 149-161, se demuestra la semejanza de la estructura de la BHE de conejo con la humana, postulándose la microvasculación cerebral de éstos como modelo de utilidad a la hora de establecer tratamientos en los casos de tumores como astrocitomas.

Existen diversos estados patológicos que pueden alterar la estructura capilar y aumentar su permeabilidad; así, por ejemplo, la isquemia¹¹³ y la anoxia producidas por alteraciones de origen vascular o de otro origen, las lesiones destructivas y proliferativas¹¹⁴ (traumatismos, neoplasias, sustancias citolíticas, soluciones hiperosmóticas), las infecciones¹¹⁵ y enfermedades auto inmunes¹¹⁶ y la pérdida de autorregulación, que puede darse en la encefalopatía hipertensiva,

¹¹³ Existen numerosos estudios al respecto. Baste citar algunos de los más recientes, como el de Skoog, I., "A review on blood pressure and ischaemic white matter lesions", *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 9 Suppl. 1, Julio, 1998: 13-19; Suzuki, H.; Nagashima, T.; Tamaki, N. y Yamadori, T., "Cerebral ischemia affects glucose transporter kinetics across the rat brain microvascular endothelium: quantitative analysis by an in situ brain perfusion method", *Surg. Neurol.*, 49(1), Enero, 1998: 67-76; Huang, F.P.; Zhou, L.F. y Yang, G.Y., "The effect of extending mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat", *Neurol. Res.*, 20(1), Enero, 1998: 57-62; Kastrup, A.; Engelhorn, T.; Beaulieu, C.; de- Crespigny, A. y Moseley, M.E., "Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood- brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat", *J. Neurol. Sci.*, 166(2), Julio, 1999: 91-99; Sercombe, R., "Vascular wall modifications after disruption of the circulation leading to cerebral ischemia", *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, 18(5), Mayo, 1999: 583-587; Yang, G.Y.; Gong, C.; Qin, Z.; Liu, X.H. y Lorris- Betz, A., "Tumour necrosis factor alpha expression produces increased blood- brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia", *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 69(1), Mayo, 1999: 135-143 y Mao, Y.; Yang, G.Y.; Zhou, L.F.; Stern, J.D y Betz, A.L., "Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion", *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, 63(2), Enero, 1999: 366-370.

¹¹⁴ Recientes trabajos investigan la permeabilidad de la barrera en casos de tumores cerebrales. Véanse al respecto, por citar un ejemplo, la publicación de Sato, S.; Kawase, T.; Harada, S.; Takayama, H. y Suga, S., "Effect of hyperosmotic solutions on human brain tumour vasculature", *Acta Neurochir. Wien.*, 140(11), 1998: 1135-1142.

¹¹⁵ Este aspecto es tema de estudio en los trabajos de Zhang, L.; Looney, D.; Taub, D.; Chang, S.L.; Way, D.; Witte, M.H.; Graves, M.C. y Fiala, M., "Cocaine opens the blood brain barrier to HIV-1 invasion", *J. Neurovirol.*, 4(6), 1998: 619-626, Prasadarao, N.V.; Wass, C.A.; Stins, M.F.; Shimada, H. y Kim, K.S., "Outer membrane protein A-promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for Escherichia coli invasion", *Infect. Immun.*, 67(11), Noviembre, 1999: 5775-5783, y Kustova, Y.; Grinberg, A. y Basile, A.S., "Increased blood- brain barrier permeability in LP-BM5 infected mice is mediated by neuroexcitatory mechanisms", *Brain. Res.*, 839(1), Agosto, 1999: 153-163.

¹¹⁶ La relación entre el sistema inmunitario y las variaciones en la permeabilidad de la BHE ha sido investigada recientemente en los trabajos de Bachert, C., "Histamine: a major role in allergy?", *Clin. Exp. Allergy*, 28 (Suppl. 6), Diciembre, 1998: 15-19; Gaillard, R.C., "Cytokines in the neuroendocrine system", *Int. Rev. Immunol.*, 17(1-4), 1998: 181-216; Aschner, M., "Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes", *Toxicol. Lett.*, 102-103, Diciembre, 1998: 283-287; Akarsu, E.S.; House, R.V. y Coceani, F., "Formation of interleukin-6 in the brain of the febrile cat: relationship to interleukin-1", *Brain Res.*, 803 (1-2), Agosto, 1998: 137-143, y Chandra, A.M.; Campbell, G.A.; Reddy, G. y Qualls, C.W. Jr., "Neurotoxicity of 1,3,5-trinitrobenzene (TNB): immunohistochemical study of cerebrovascular permeability", *Vet. Pathol.*, 36(3), Mayo, 1999: 212-220.

la hipertensión endocraneal, los estados convulsivos y la hipercapnia.

II.5.2.- Mecanismos de transporte

En el sistema nervioso central, por sus necesidades y características anteriormente expuestas, no existen prácticamente ni filtración ni pinocitosis. En consecuencia, los fármacos están obligados a difundir a través de la doble membrana endotelial y del citoplasma, de la membrana basal, los pericitos y los pies gliales. Esto explica el hecho de que su velocidad de difusión dependa estrictamente de su liposolubilidad y de la concentración en el medio de moléculas no ionizadas. Por eso, cambios de pH en el plasma y en el espacio extracelular alteran la velocidad de difusión. Como es natural, la fracción fijada a proteínas tampoco atravesará la BHE. Existe, en cambio, transporte activo en la célula endotelial, con sistemas específicos de transporte para hexosas, grandes aminonoácidos neutros, aminoácidos básicos y ácidos monocarboxílicos de cadena corta. Se trata de un transporte saturable y que muestra posibilidades de inhibición competitiva, como se verá más adelante.

La célula endotelial del capilar cerebral tiene capacidad de modificar la estructura de algunos fármacos mediante sus mecanismos enzimáticos (así, por ejemplo, convierten el aminoácido dopa en dopamina). Esta modificación puede ocurrir también después de haber atravesado el capilar la molécula en cuestión, en el propio parénquima cerebral; así, la diacetilmorfina (heroína), que es muy liposoluble, se convierte intracerebralmente en morfina, que es poco liposoluble.

1.- Difusión pasiva

La BHE se comporta según las leyes físicas de la difusión,¹¹⁷ lo que quiere decir que su permeabilidad depende del gradiente osmótico, la presión hidrostática, cargas eléctricas, constante de disociación, tamaño de la molécula, solubilidad en lípidos e índice de captación cerebral (ICC).¹¹⁸

- Las *sustancias liposolubles* pasan con mayor facilidad la BHE, dependiendo de su coeficiente de partición en heptano. Así, sustancias de alto coeficiente como O₂, CO₂, Xenon, tiopental, aminopirina, etanol, propanol, butanol, nicotina, heroína, etc., pasan sin dificultad a través de la barrera, dependiendo solamente del flujo cerebral vascular, y alcanzan un equilibrio con la concentración en sangre en menos de 5 minutos.
- Las *sustancias hidrosolubles*, tanto las ionizables como las no ionizables, como la urea, el glicerol, manitol, inulina, etc., no dependen del flujo vascular cerebral sino, fundamentalmente, del tamaño de la molécula, al realizarse su difusión a través de los poros *Gap* y *tight junctions*, que se encuentran rellenos de agua, y cuyo diámetro ha sido anteriormente definido.

¹¹⁷ Fischer, H.; Gottschlich, R. y Seelig, A., "Blood- brain barrier permeation: molecular parameters governing passive difusión", *J. Membr. Biol.*, 165(3), Octubre, 1998: 201-211, informan en su trabajo sobre los parámetros que gobiernan la difusión pasiva en la BHE.

¹¹⁸ Véase, acerca de modelos *in vitro* de la permeabilidad de la BHE para sustancias polares, el estudio de Jonson, M.D. y Anderson, B.D., "In vitro models of the blood- brain barrier to polar permeants: comparison of transmonolayer flux measurements and cell uptake kinetics using cultured cerebral capillary endothelial cells", *J. Pharm. Sci.*, 88(6), Junio, 1999: 620-625.

El agua penetra tan rápidamente como los componentes liposolubles, lo que explica que las hiper e hiponatremias produzcan, respectivamente, hiposmolaridad e hiperosmolaridad relativas en el SNC o, lo que sería lo mismo, deshidratación y edema cerebral,¹¹⁹ respectivamente. Las sustancias ionizadas cuyo tamaño excede al del poro, como es el caso de las sulfamidas, traspasan la BHE en virtud de la liposolubilidad de su fracción no ionizada.

2.- Transporte activo

Este tipo de transporte depende del aporte energético, y se puede bloquear mediante ouabaína.

La membrana plasmática de las células endoteliales posee una desigual distribución de sus bombas iónicas, de modo que las bombas de Na^+/K^+ o ATPasas Na^+/K^+ , son mucho más abundantes en la cara basal que en la luminal, transportando sodio hacia el tejido cerebral y potasio hacia el interior de la célula en primer lugar, y hacia la luz del vaso después; de esta manera se consigue mantener constantemente baja la concentración de potasio intercelular.¹²⁰ Algo similar ocurre con el 5-HIAA, metabolito de la serotonina, que es depurado del

¹¹⁹ Gisselsson, L.; Smith, M.L. y Siesjo, B.K., "Influence of hypoglycaemic coma on brain water and osmolality", *Exp. Brain Res.*, 120(4), Junio, 1998: 461-469, estudian la influencia del coma hipoglucémico en la osmolaridad cerebral.

¹²⁰ Véase el estudio de Keep, R.F.; Ulanski, L.J.; Xiang, J.; Ennis, S.R. y Lorris-Betz, A., "Blood-brain barrier mechanisms involved in brain calcium and potassium homeostasis", *Brain Res.*, 815(2), Enero, 1999: 200-205, acerca de los mecanismos de la BHE implicados en la homeostasis de calcio y potasio cerebrales.

cerebro y del líquido cefalorraquídeo hacia la sangre (puede ser inhibido por probenecid, inhibidor del transporte de ácido úrico en el túbulo renal).

- La *glucosa* es transportada al SNC, en función de su concentración plasmática, por medio de un transportador "carrier" que se satura a concentraciones superiores a 4,3 mM (transporte, como ya se había comentado, saturable). Este transportador es solamente capaz de transportar los D-isómeros, mostrando una inhibición cruzada entre ellos. Así, la 2- desoxiglucosa compite con la D-glucosa. Otras hexosas, como la 3-O- metil glucosa, manosa y galactosa se transportan mediante un mecanismo similar.
- Los *aminoácidos* son transportados al SNC por un mecanismo de transporte activo estereoespecífico, saturable y competitivo.¹²¹ Se trata de un transporte que necesita energía y es de capacidad limitada, pudiendo competir varios aminoácidos de estructura similar por un mismo sistema.

Se han establecido cuatro grandes grupos o sistemas:

- 1.- Sistema L o leucina: transporte para aminoácidos grandes neutros:¹²²

¹²¹ Sobre el transporte activo y metabolismo cerebral de aminoácidos versa el estudio de Pardridge, W.M., "Blood- brain barrier carrier mediated transport and brain metabolism of amino acids", *Neurochem. Res.*, 23(5), Mayo, 1998: 635-644.

¹²² Véase el trabajo de Boado, R.J.; Li, J.Y.; Nagaya, M.; Zhang, C. y Pardridge, W.M., "Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood- brain barrier", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(21), Octubre, 1999: 12079-12084, sobre la expresión selectiva de transportador de grandes aminoácidos neutros en las células endoteliales de los capilares del cerebro.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Leucina, fenilalanina, tirosina, metionina, isoleucina, triptófano, histidina, valina, DOPA y 5- HTP.

2.- Sistema A o alanina: transporte para aminoácidos pequeños y neutros: alanina, serina, treonina, metionina, asparragina, prolina, glicina y GABA.

3.- Sistema B o básico: transporte para aminoácidos básicos: arginina, ornitina y lisina.

4.- Sistema DC o dicarboxílico: transporte para aminoácidos ácidos dicarboxílicos: aspártico y glutámico.

- Las monoaminas no polares presentan índices de captación cerebral muy altos (60%), pero la introducción de grupos polares -OH en la molécula, produce un fuerte descenso en el índice de captación.

II.5.3.- Barrera enzimática

Los enzimas presentes en la BHE tienen como misión destruir, por una parte, las sustancias -generalmente neurotransmisores- circulantes en sangre y que pudieran pasar al SNC estimulando las sinapsis, y por otra, metabolitos presentes en el SNC que deben ser eliminados.

Entre los enzimas que constituyen la barrera enzimática de la barrera hematoencefálica podemos encontrar dopa-decarboxilasa, monoamino-oxidasa, gamaglutamil transpeptidasa, etc.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

- DOPA decarboxilasa (DOPA-DC) o l-aromático aminoácido decarboxilasa (l-AAADC): esta enzima realiza el paso de DOPA a DOPamina, y de 5-HTP a 5HTA; es capaz de decarboxilar concentraciones de hasta 10^{-5} molar de sustrato, cantidad muy superior a la existente en la sangre. No obstante, la DOPA que escapase a la DOPA-DC, sería degradada por la catecol-o-metiltransferasa (COMT), y convertida en 3-oximetil DOPA (3-OM-DOPA).
- La Monoaminoxidasa (MAO) y Catecol-o-metil transferasa (COMT), metaboliza las concentraciones mínimas de monoaminas circulantes: la MAO-A, Noradrenalina (NA) y 5-HT. La MAO-B a la Dopamina (DA). La MAO-B se inhibe por el deprenil.
- La glutamil transpeptidasa (GPT) es un transportador inespecífico de amino ácidos mediante la peptidación de éstos con el terminal -glutamil del glutation.

Últimamente se ha relacionado a las metaloproteinasas de matriz con la patogénesis de diferentes enfermedades del sistema nervioso central.¹²³ Las metaloproteinasas de matriz (MMPs: matrix metalloproteinases) son una familia

¹²³ Las gelatinasas A y B, por ejemplo, son un exponente de este grupo (MMPs), capaces de aumentar la permeabilidad de la BHE, como refleja el trabajo de Gasche, Y.; Fujimura, M.; Morita-Fujimura, Y.; Copin, J.C.; Kawase, M.; Massengale, J. y Chan, P.H., "Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood- brain barrier dysfunction", *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 19(9), Septiembre, 1999: 1020-1028.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

de proteasas neutras implicadas en procesos, tanto normales como patológicos, del sistema nervioso central. Liberadas normalmente en el espacio extracelular, estas enzimas destruyen la matriz extracelular a fin de permitir el crecimiento celular y facilitar la remodelación de aquélla.

La proteólisis se convierte en patológica cuando el equilibrio entre las proteasas y sus inhibidores (TIMPs: tissue inhibitors to metalloproteinases) se pierde. Las MMPs aumentan la permeabilidad de los capilares, y han sido implicadas en procesos de desmielinización. Se ha comprobado que, en enfermedades neurológicas como el Alzheimer,¹²⁴ la isquemia, tumores cerebrales, determinadas infecciones,¹²⁵ o la esclerosis múltiple, los niveles de proteasas degradantes de matriz se ven significativamente aumentados.¹²⁶

Cualquier agente que afecte al proceso proteolítico en cualquiera de sus sitios de regulación será, por tanto, útil en las terapias de estas enfermedades en las que se da un desequilibrio patológico entre MMPs y TIMPs.

¹²⁴ En la enfermedad de Alzheimer las MMPs podrían mediar en la deposición de proteínas beta-amiloides (Yong, V.W.; Krekoski, C.A.; Forsyth, P.A.; Bell, R. y Edwards, D.R., "Matrix, metalloproteinases and diseases of the CNS", *Trends Neurosci.*, 21(2), Febrero, 1998: 75-80).

¹²⁵ Kieseier, B.C.; Paul, R.; Koedel, U.; Seifert, T.; Clements, J.M., Gearing, A.J.; Pfister, H.W. y Hartung, H.P., "Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis", *Brain*, 122 (Pt. 8), Agosto, 1999: 1579-1587.

¹²⁶ Lukes, A.; Mun- Bryce, S.; Lukes, M. y Rosenberg, G.A., "Extra cellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases", *Mol. Neurobiol.*, 19(3), Junio, 1999: 267-284.

II.5.4.- Presencia de fármacos en el líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo (LCR), originado en los plexos coroideos, está separado del espacio extracelular cerebral por la pía-aracnoides o por la membrana endotelial. Esta separación es prácticamente virtual, por lo que puede considerarse el líquido cefalorraquídeo como una prolongación del líquido intersticial cerebral; en efecto, su composición iónica es parecida a la del líquido intersticial cerebral, y asimismo carece, prácticamente, de proteínas.¹²⁷ Por este motivo, la concentración de fármacos en el líquido cefalorraquídeo refleja con fiabilidad la concentración de éstos en cerebro,¹²⁸ siendo ambas función de varios factores: la *fracción libre* en plasma, el coeficiente de distribución lípido/agua del fármaco y el pH.

Los fármacos entran en el líquido cefalorraquídeo a partir de los capilares de los plexos coroideos (ultrafiltrado) y a partir del espacio extracelular cerebral, saliendo del líquido cefalorraquídeo al espacio extracelular y, por las vellosidades, hacia la sangre (como se ve reflejado en la figura 4).

¹²⁷ La determinación cuantitativa de proteínas del líquido cefalorraquídeo es utilizada en la diagnosis de daños en la BHE, así como de enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central; este es el tema de estudio, por ejemplo, de la publicación de Turecky, L.; Kalina, P.; Uhlikova, E. y Prochazkova, L., "Cerebrospinal fluid proteins in the diagnosis of disorders of the blood- cerebrospinal fluid barrier in central nervous system diseases", *Brat. Lek. Listy*, 99(7), Julio, 1998: 347-350.

¹²⁸ En el trabajo de Cohen, O.; Zylber-Katz, E.; Caraco, Y.; Granit, L. y Levy, M., "Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyron metabolites after a single oral dose of dipyron", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 54(7), Septiembre, 1998: 549-553, por ejemplo, se estudia si determinado analgésico (dipirona) es capaz de atravesar la BHE, midiendo su concentración en el líquido cefalorraquídeo y en plasma

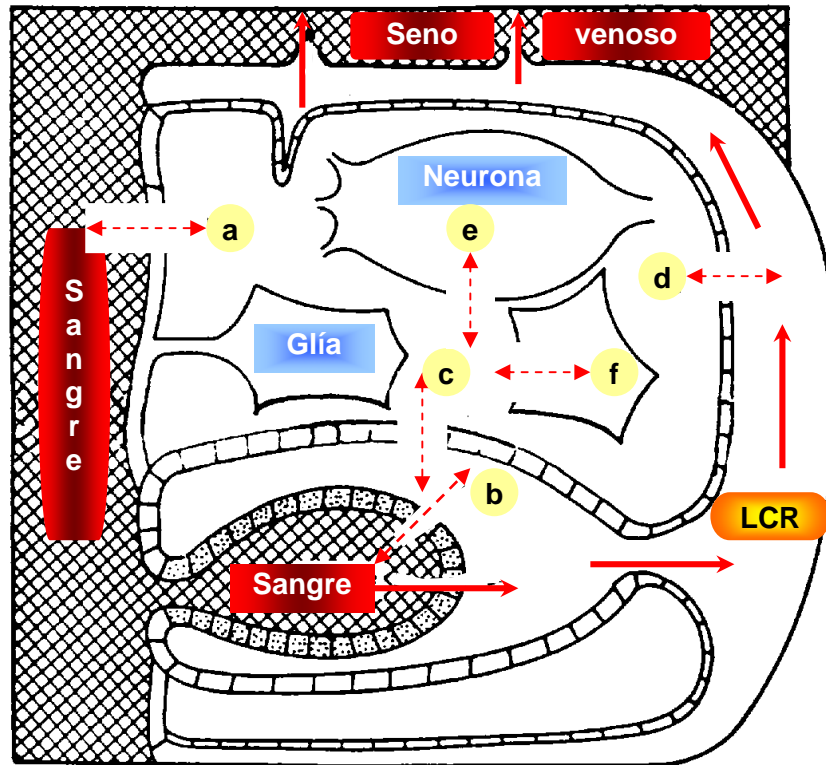


Fig. 4: ESQUEMA DE LOS COMPARTIMIENTOS INTRACRANEALES: Las flechas continuas señalan la dirección del flujo del LCR. Las flechas discontinuas indican los sitios en donde existe difusión de agua y solutos: **a)** A través de la barrera hematoencefálica (de capilar a espacio intersticial). **b)** A través del epitelio de los plexos coroideos. **c)** a través de la membrana endotelial entre el espacio ventricular y el espacio intersticial. **d)** A través de la piamadre entre el espacio intersticial y el espacio subaracnoideo. **e)** A través de la membrana neuronal. **f)** A través de la membrana de células gliales.

Existen fenómenos de transporte activo de fármacos en los plexos coroideos y en la pared capilar, que pueden ser inhibidos farmacológicamente (por ejemplo, probenecida para ciertos metabolitos ácidos).

Dada la comunicación sin solución de continuidad que existe a lo largo de los espacios ocupados por el líquido cefalorraquídeo, las moléculas que en él se encuentran tienden a difundir libremente y a igualar sus concentraciones. Pero cada espacio de líquido cefalorraquídeo tiene sus peculiaridades debido al territorio del SNC en que se ubica y a los procesos de intercambio que en él ocurren. Por ello, la concentración de fármacos y de productos endógenos en el líquido cefalorraquídeo de la región lumbar suele diferir de la existente en la cisterna magna o en los ventrículos cerebrales.

A pesar de los importantes avances en neurociencia de los últimos años, las posibles opciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central no resultan, con frecuencia, todo lo efectivas que deberían, debido a la presencia de la barrera hematoencefálica.

Es, por lo tanto, crucial que la investigación en la próxima década se centre en el estudio de los mecanismos de acción de esta barrera y en la manera de eludir su control en los casos en que es imprescindible el paso de determinadas sustancias a concentraciones terapéuticas,¹²⁹ así como en el

¹²⁹ Uno de los métodos utilizados recientemente para alterar la permeabilidad de la BHE, aumentando o disminuyendo con ello la liberación de drogas en el cerebro, es la modulación de la P- glicoproteína (P-gp), cuyos sustratos son activamente bombeados de la célula a la luz capilar. Muchos activadores o inhibidores de P-gp son capaces de acrecentar los efectos terapéuticos de fármacos con acción central, así como de disminuir los efectos centrales adversos de drogas con acción periférica (Jolliet- Riant, P. y Tillement, J.P., "Drugs transfer across the blood- brain barrier and improvement of brain delivery", *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13(1), 1999: 16-26).

diseño de fármacos capaces de atravesar los capilares cerebrales, bien por su naturaleza química, bien aprovechando los mecanismos de transporte activo existentes en las células endoteliales.¹³⁰

¹³⁰ Es de reseñar, en este sentido, la Tercera Conferencia Internacional de Biología Cerebrovascular y Barrera Hematoencefálica, que a tal fin tuvo lugar en Gleneden Beach, en Marzo de 1998.

II.6.- INCIDENCIA ECOTOXICOLÓGICA DE METALES EN POBLACIONES HUMANAS

II.6.1.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS ASPECTOS FUNCIONALES DE LOS ELEMENTOS TRAZA

El Parlamento Europeo aconseja un programa específico de investigación experimental sobre el efecto de los campos magnéticos en la salud humana, marcando en él la pauta de estudiar la conjunción del efecto químico de contaminantes ambientales con el de los campos magnéticos, es decir, el sinergismo que puede darse en el cuerpo humano entre el efecto de campos magnéticos y xenobióticos (compuestos químicos que contaminan el medio ambiente, aguas y alimentos).¹³¹

En todos los seres vivos, sean animales o vegetales, seres superiores o inferiores, existen iones metálicos que desempeñan un papel vital para el organismo o para alguna de sus funciones biológicas; éstos son esenciales y pueden estar en cantidades abundantes (elementos con función plástica: sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro) o en cantidades traza (oligoelementos: manganeso, cobre, cobalto, zinc, molibdeno); de muchos de estos elementos traza, esenciales para la conservación de la salud y el correcto funcionamiento del sistema reproductor, se conocen con cierta precisión sus funciones, bien

¹³¹ D.O.C.E., N° C 205/440, Documento N° A3-0238/94 de 5 de Mayo de 1994.

como cofactores enzimáticos, bien como electrolitos en los líquidos corporales, así como su importancia en los sistemas de transporte de oxígeno o como componentes de macromoléculas que no tienen acción enzimática (como es el caso de la insulina, transferrina, ceruloplasmina, metalotioneína y selenoproteínas).¹³²

Pero además, los organismos vivos presentan muchos elementos metálicos, en cantidades traza, que no ejercen una acción biológica conocida (aluminio, rubidio) y otros (plomo, mercurio), introducidos por contaminación, que son biológicamente activos y capaces de ejercer una acción tóxica si sus concentraciones sobrepasan determinados límites. Igualmente, los elementos esenciales pueden resultar tóxicos si se encuentran a concentraciones que superen a sus mecanismos de control bioquímico, como es el caso, por ejemplo, de la siderosis (exceso de hierro). Se puede afirmar, en resumen, que el cuerpo humano contiene, y es capaz de incorporar, cantidades traza de la mayor parte de los elementos de la Tabla Periódica,¹³³ si no de todos ellos. Algunos investigadores especialistas en el estudio de la significación biológica de los

¹³² Ya en el siglo XVII se reconoció la importancia del hierro en la alimentación humana, y en el siglo XIX se descubrió la necesidad del consumo de yodo para el normal funcionamiento orgánico. Más recientemente, en las décadas de los años veinte, treinta y cincuenta, se llevaron a cabo numerosos experimentos que revelaron nuevos aspectos sobre los elementos químicos y su función fisiológica; la lista de elementos químicos con función biológica fue ampliándose progresivamente, sobre todo en la década de los años setenta y en los noventa. Como resultado de los más recientes estudios, ha sido posible, por ejemplo, establecer que metales que se suponían exclusivamente tóxicos para el organismo, tales como Pb, As y Se, tienen funciones fisiológicas determinadas e, incluso, por lo menos en animales, se les puede considerar como esenciales. Evidentemente, la cantidad de estos elementos traza necesaria para el mantenimiento de las funciones corporales es menor que la cantidad de los mismos cuya ingestión acarrea efectos tóxicos.

¹³³ De todos estos elementos, el hierro es el más abundante, mientras que elementos tales como el cromo, cobalto e incluso metales preciosos (plata y oro), están presentes en los tejidos casi en concentraciones indeterminables.

oligoelementos (como Klaus Schwarz) sugieren que, probablemente, todos los elementos del Sistema Periódico tienen -o se descubrirá que tienen- alguna función fisiológica. De cualquier manera, ciertos elementos como el cadmio, el plomo o el arsénico, siempre se caracterizarán por sus propiedades tóxicas y nocivas sobre el metabolismo.

II.6.1.a.-Fuentes de contaminación metálica

Procesos naturales tales como la química meteorológica y las actividades geoquímicas, liberan ciertos elementos procedentes de la corteza terrestre a la litosfera, la atmósfera y la hidrosfera. El transporte y transformación de estos elementos, incluidos los metales y sus sales, implican procesos de reciclaje geoquímico y biológico, que constituyen los denominados ciclos biogeoquímicos de la tierra.

La influencia de la polución sobre el medioambiente, en general a través de actividades tales como la minería, la combustión de carburantes fósiles, la agricultura y la urbanización, han acelerado el flujo de trazas de metales y sus sales en la ecosfera. La tasa de entrada global, en la actualidad, de metales tales como el mercurio, plomo, zinc, y cadmio, excede con mucho la tasa de los ciclos bioquímicos. Para algunos metales, las contribuciones globales procedentes de fuentes antropogénicas son muy pequeñas comparadas con los flujos naturales; no obstante, pueden ser causa de contaminaciones

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

localizadas tales como las que se dan en el caso de la minería (residuos y lixiviados).

Las actividades humanas que constituyen la fuente primordial de introducción de metales en el medio ambiente, sobre todo en el acuático, son:

1. Operaciones mineras: explotación de minas y procesado de los minerales, fundiciones y operaciones de refinado y purificación, que dan origen a la dispersión y deposición de grandes cantidades de metales como plomo, arsénico y plata.
2. Efluentes domésticos y escurrimientos urbanos: residuos metabólicos, corrosión de conducciones de agua y variados productos de consumo que cuentan en su formulación con diversos metales.
3. Residuos y descargas industriales: las concentraciones de metales en aguas residuales industriales son generalmente del orden de mg/L, dependiendo los metales del tipo de industria de que se trate.
4. Agricultura: la heterogénea naturaleza de las actividades y prácticas agrícolas dificulta la evaluación global de la significación de metales pesados con este origen.

Todas estas fuentes contaminantes hacen que las cantidades de plomo, mercurio, vanadio, zinc, etc., presentes en nuestro medio sean muy superiores a las deseables, ocasionando perturbaciones ecológicas,

particularmente en los sistemas acuáticos¹³⁴, y afectando directamente a la salud humana.

II.6.1.b.- Mecanismos de toxicidad

Los mecanismos generales de toxicidad para los iones metálicos son:

1. Bloqueo de los grupos funcionales biológicos esenciales de las biomoléculas, principalmente tiólicos (-SH) de proteínas y enzimas.
2. Desplazamiento de los iones metálicos esenciales en las biomoléculas.
3. Modificación de la conformación activa de las biomoléculas.

Además de los trastornos que lo anteriormente expuesto puede provocar, diversos estudios epidemiológicos han proporcionado evidencia suficiente como para asegurar que exposiciones laborales o medioambientales a ciertos compuestos metálicos están asociados a cáncer en humanos.¹³⁵ El interés de la capacidad mutagénica de los compuestos metálicos tiene su origen en la búsqueda de mecanismos lógicos que expliquen la carcinogenicidad de estos compuestos. Además de las evidencias en humanos, hay pruebas de

¹³⁴ Fernández Ipar, A. y Pérez Calvo, M., "Estimación de tasas de acumulación de productos químicos en vertebrados acuáticos". *BIO, Colegio Oficial de Biólogos*, 13, Abril, 1998: 14-16.

¹³⁵ El riesgo carcinogénico de compuestos metálicos para el ser humano ha sido evaluado por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), en sus monografías: "Arsenic and inorganic arsenic compounds", *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.*, 2, 1973; "Some metals and metallic compounds", *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.*, 23, 1980; "Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1- 42, supplement 7", *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, 1987 y "Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry", *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.*, 1993. Asimismo se pone de manifiesto este aspecto de los metales en el trabajo de Magos, L., "Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: physicochemical properties, kinetics, and the active species", *Environ. Health Perspect.*, 95, 1991: 157- 189.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

compuestos metálicos inductores de tumores en animales de experimentación.¹³⁶ La reciente identificación y clonación de oncogenes mutantes, así como de genes supresores de tumores, ha proporcionado pruebas concluyentes de que los procesos de mutación en la célula están implicados en la conversión de células normales en malignas.

Así pues, el conocimiento del tipo de cambios genéticos provocados por los compuestos metálicos, debería conducir a claves importantes para la comprensión de sus efectos carcinogénicos, así como de otros efectos de componente genotóxico.

Se desconoce aún el mecanismo de la carcinogénesis metálica, aunque evidencias recientes parecen sugerir que los metales descritos como carcinógenos inducen la genotoxicidad mediante diversos procesos.¹³⁷ En este sentido, se ha comprobado que ciertos metales con acción carcinogénica probada, no ocasionan daños a ADN aislado. Se postula, por tanto, en estos casos, que dichos metales reaccionan con determinados compuestos endógenos, de manera que generan especies activas, causantes del daño genético. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sería una de estas especies. Este compuesto se halla habitualmente en el organismo de manera natural, como resultado de la acción de diversas enzimas.¹³⁸ Parece ser que las especies

¹³⁶ IARC, 1980, "Overall...", op. cit., 1-42.

¹³⁷ Como describe Snow, E.T., "Metal carcinogenesis: mechanistic considerations", *Pharmacol. Ther.*, 53, 1992: 31- 65.

¹³⁸ Véase, al respecto, el trabajo de Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", *Methods. Enzymol.*, 186, 1990: 1- 85.

activas del oxígeno (ROS) están implicadas en la iniciación, promoción y conversión de diferentes estadios del cáncer. Estas especies, altamente reactivas, no sólo causan daños en el ADN, sino que también son capaces de alterar el sistema celular antioxidante de defensa. Este sistema consiste en:¹³⁹

- a) Antioxidantes de bajo peso molecular (por ejemplo, vitaminas E y C, ácido úrico, GSH, β - caroteno).
- b) Enzimas antioxidantes (por ejemplo, GSH- peroxidasa, catalasa, SOD, GSSG- reductasa).
- c) Enzimas reparadores en la degradación del ADN (exonucleasa III, endonucleasas III y IV, glicosilasas, polimerasas).

En resumen, los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno, producidas constantemente en el cuerpo humano como respuesta a los requerimientos fisiológicos de éste, pueden resultar tóxicos si se generan en exceso, y esta toxicidad se ve agravada por la presencia de iones metálicos;¹⁴⁰ dichos iones reaccionan con $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , dando lugar a especies altamente reactivas como OH^{\cdot} y complejos metal-oxígeno, capaces, como se ha señalado, de provocar daños genéticos. Existen evidencias de que, ni el $O_2^{\cdot -}$, ni el H_2O_2 , reaccionan con el ADN en ausencia de iones metálicos.¹⁴¹ Los radicales hidroxilo atacan a lípidos proteínas y ADN; la reacción inicial con cada uno de estos tipos

¹³⁹ Según Saran, M. y Bors, W., "Radical reactions in vivo: an overview", *Radiat. Environ. Biophys.*, 29, 1990: 249- 262.

¹⁴⁰ Halliwell y Gutteridge, 1990, "Role of free...", op. cit., 1- 85.

¹⁴¹ Dizdaroglu, M. et al., "Damage to the bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions", *Arch. Biochem. Biophys.*, 285, 1991: 317- 324.

de moléculas es la formación de peróxidos que pueden interactuar con otras moléculas.

- **Lípidos:** la peroxidación induce enlaces cruzados entre los lípidos de las membranas, creando dominios de moléculas no funcionales. La membrana celular, formada básicamente por lípidos, se endurece y adquiere formas extrañas. Esto constituye un problema especialmente en los eritrocitos, ya que al carecer de núcleo, no poseen la capacidad de reparar los daños de la membrana, por lo que pierden la elasticidad necesaria para pasar a la microcirculación.¹⁴²
- **Proteínas:** la reacción de proteínas causada por los radicales libres puede dar lugar a clusters, sobre todo en las membranas celulares.¹⁴³ De nuevo, los eritrocitos son particularmente sensibles a este daño, al no presentar mecanismos de reparación de membranas. Las células del sistema inmunológico reconocen los clusters como anormales, y los anticuerpos de éstos inducen la retirada de estas células del torrente sanguíneo. El resultado es una hemólisis acentuada.
- **ADN:** los enlaces cruzados del ADN disminuyen la replicación de la célula, lo que conduce a la muerte celular.

¹⁴² Clark, M.R. et al., "Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells", *J. Clin. Invest.*, 65, 1980: 189- 196.

¹⁴³ Rank, B.H. et al., "Abnormal redox status of membrane- protein thiols in sickle erythrocytes", *J. Clin. Invest.*, 65, 1985: 1531- 1537; Corbett, J.D., "Band 3 and glycoporphyrin are progressively aggregated in density- fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies", *J. Clin. Invest.*, 91, 1993: 208- 217.

El cuerpo humano neutraliza las especies reactivas de oxígeno mediante diversas moléculas:

a.- Enzimas: las más relevantes son la superóxido dismutasa del citosol eucariótico,¹⁴⁴ la catalasa, una peroxidasa con un elevado recambio metabólico,¹⁴⁵ glutatión peroxidasa, una enzima con selenio,¹⁴⁶ y glucosa-6-fosfato hidrogenasa, enzima que controla el paso de la hexosa monofosfato al correspondiente fosfogluconato (ciclo pentosa fosfato) generando NADPH+H. El aumento de NADPH+H inhibe a la enzima y mantiene controlados los niveles de G-SH (glutatión)

b.- Antioxidantes: los antioxidantes que presentan capacidad de reacción con radicales libres son: ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión,¹⁴⁷ homocisteína, diversos compuestos de cisteína, metalotioneína, glutamiltaurina y la coenzima-Q (ubiquinona, cadena respiratoria); compuestos que facilitan el paso de los electrones de FDH a citocromos, vitamina A y compuestos afines, y vitamina E.

c.- Quelantes nativos de metales: los quelantes que protegen de las concentraciones excesivas de metales (principalmente de Fe) del cuerpo

¹⁴⁴ Enzimas que contienen Cu y Zn, frente a las enzimas mitocondriales que contienen Mn.

¹⁴⁵ De 44.000 moléculas de H₂O₂, por molécula de catalasa, por segundo.

¹⁴⁶ Razón por la que este elemento es dietéticamente esencial.

¹⁴⁷ Necesario para conservar la integridad de los eritrocitos y de las membranas celulares, y que, al reducir grupos -SH de enzimas, reduce también muchas moléculas e importantes proteínas, como la insulina.

humano son: ferritina, transferrina, lactoferrina, hemoglobina, mioglobina, ferredoxinas y metalotioneínas¹⁴⁸. Para el cobre existe la ceruloplasmina.

De entre los metales pesados hemos elegido para nuestro estudio el plomo, al ser el metal tóxico más extendido, detectable en casi todas las fases del ambiente inerte y en los sistemas biológicos. Como representante de los oligoelementos hemos utilizado el hierro, el más abundante en los seres vivos de forma natural pero que, por sus características paramagnéticas, podría verse alterado por las radiaciones a estudio.

II.6.2.- EL PLOMO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, METABÓLICOS Y CLÍNICOS

II.6.2.a.- Caracterización: propiedades físico-químicas. Presencia en el medio

El plomo es un elemento químico perteneciente al grupo de los metales de transición, sólido en condiciones normales, y que se encuentra ubicado en el grupo IVa, periodo 6 del Sistema Periódico de los Elementos. Su símbolo es Pb, y sus características las siguientes: peso atómico = 207,19; número atómico = 82; valencia = +2 ó +4.

¹⁴⁸ M. Pérez-Calvo, O. García, G. Carbonell, J.V. Tarazona y B. Ribas, "Metalotioneína en trucha como biomarcador de contaminación acuática por cadmio", *Rev. Toxicol.* 16 (3), 1999: 72; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M. y Ribas Ozonas, B., "Electroforesis capilar de metalotioneína en hígado de mamífero como proteína bioindicadora de la contaminación ambiental por residuos metálicos", *Actas, V Congreso Internacional de Química de la ANQUE*, (II), 1999: 347-356; O. García Arribas, M. Pérez Calvo y B. Ribas Ozonas, "Detección de la exposición al plomo mediante análisis de metalotioneína hepática por electroforesis capilar". *An. Real Acad. Farm.*, 64 (4), Diciembre, 1998: 599-614.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Se trata de un elemento metálico de color azulado, blando, con bajo punto de fusión y elevada densidad; es maleable y resistente a la corrosión, de fácil procesamiento y bajo coste, lo que hace que se utilice en la fabricación de una amplia gama de productos.

Se encuentra habitualmente de forma natural en la corteza terrestre en pequeñas cantidades. Tanto el elemento como sus compuestos se detectan en el medio, principalmente debido a fuentes antropogénicas; así, se aprecia, en mayor o menor medida, en plantas y animales de consumo humano, aire, agua potable, aguas continentales, océanos, polvo y tierra. El plomo presente en el aire puede ser transportado a puntos muy alejados del lugar donde es producido, ya que se une al polvo. Este polvo cargado de plomo es depositado en el suelo por la lluvia,¹⁴⁹ donde puede permanecer durante años.¹⁵⁰

El consumo de plomo ha preocupado desde antiguo a la humanidad,¹⁵¹ no tanto por sus efectos esenciales en el organismo como por sus propiedades tóxicas, que pueden ser especialmente notables en los niños.¹⁵²

¹⁴⁹ van-Alphen, M., "Atmospheric heavy metal deposition plumes adjacent to a primary lead-zinc smelter" *Sci. Total Environ.* 236, 1999: 119- 134.

¹⁵⁰ Aunque hubo un tiempo en que se pensó que el plomo era ambientalmente estable, en la actualidad se sabe que, por ejemplo, un perdigón de plomo permanece superficialmente durante muchos años (de 30 a 300), liberando sales del metal fuertemente contaminantes (óxidos, carbonatos y sulfatos), que son absorbidas por las plantas de la zona, y quedando durante ese tiempo a disposición de los animales.

¹⁵¹ Así, la descripción más antigua de envenenamiento por plomo de la que se tiene noticia data, aproximadamente, del 2000 A.C., atribuida al filósofo griego Nikander de Colophon .

¹⁵² Weeden, R.P., *Poison in the Pot: the legacy of lead*. Carbondale, Ill: Southern Illinois, ed. University Press, 1984.

Últimamente, aparte de su presencia como resultado de actividades industriales, está también siendo motivo de estudio por su acumulación en cotos de caza y campos de tiro debido a los perdigones¹⁵³ y cartuchos que lo incorporan en su composición, provocando el envenenamiento de diversas especies animales, a partir de las cuales, al resultar depositado en distintos órganos de estos consumidores primarios, pasa a la cadena alimentaria¹⁵⁴.

II.6.2.b.- Fuentes de contaminación; vías de exposición

- **Fuentes de contaminación**

Se pueden considerar como principales fuentes de contaminación por plomo las que a continuación se exponen:

1. Ocupacional:

La producción de plomo metálico es de 4-6 millones de toneladas anuales. De ellas, la cantidad que se destina a la fabricación de baterías y pinturas es del 76%; menos del 1% de la producción de Pb se destina a la fabricación de perdigones y pesos de pesca.

¹⁵³ Trabajos recientes tratan este tema. Véanse, al respecto, el de Farell, S.E. et al., "Blood lead levels in emergency department patients with retained lead bullets and shrapnel", *Acad. Emerg. Med.*, 6 (3), Marzo, 1999: 208- 212, o el de John, B.E. y Boatright, D., "Lead toxicity from gunshot wound", *South Med. J.*, 92 (2), Febrero, 1999: 223-224.

¹⁵⁴ En el año 2001, se ha conseguido, por fin, de la Administración, una prohibición a la utilización de perdigones de plomo en los humedales españoles que ha entrado en vigor el 1 de Octubre; véase al respecto el artículo de Pérez Calvo, M.; García Arribas, O. y Fernández Ipar, A., "Plumbismo: en busca de la alternativa no tóxica", *Bio (COB)*, 16, Madrid, Abril, 1999:19-23.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

La intoxicación crónica por plomo es el prototipo de intoxicación profesional por un veneno mineral. Las profesiones expuestas a la misma son numerosas: metalurgia y refinamiento del metal; fusión de Zn viejo o lingotes de Pb; fabricación de munición (perdigones) y pesos de pesca (sinkers y jigs), industria química de óxidos de Pb (pinturas y colorantes), manufactura de cerámica, vidrio y plásticos; tuberías de plomo y fabricación de baterías, entre otros.

Los obreros más expuestos son los dedicados a la tostadura del mineral, debido a los vapores de metal desprendidos, así como los fabricantes y manipuladores de colorantes de plomo, tintes, barnices, etc. Son, por tanto, sujetos de exposición ocupacional al plomo, todos aquellos profesionales relacionados con los más de 150 oficios y manipulaciones en los que interviene este metal.

2. Medioambiental:

Los líquidos combustibles de los motores de explosión son una de las fuentes de intoxicación por plomo más frecuentes: se han descrito correlaciones claras entre concentraciones plasmáticas de plomo y exposición o empleo frecuente de gasolinas diversas; afortunadamente, se tiende en la actualidad a utilizar gasolinas cada vez más pobres en plomo, hasta tal punto que, hoy en día, este problema no se considera ya un asunto de Salud Pública; no obstante, el plomo procedente del polvo

de las emisiones automovilísticas se encuentra ya depositado en el suelo,¹⁵⁵ donde permanecerá durante años.

De igual manera, constituyen fuentes de contaminación ambiental las pinturas a base de plomo, los suelos y polvo cercanos a las industrias relacionadas con el metal, las carreteras, ciertos artículos de cerámica y las actividades de caza y pesca.

Es interesante señalar que el contenido de plomo de los alimentos depende del tipo de suelo en el que se cultivan o viven las plantas y animales. Así, por ejemplo, lugares en los que la concentración atmosférica de plomo es elevada (como consecuencia de la excesiva cantidad de gases expulsados por los tubos de escape de los vehículos), o aquellos en los que este elemento se encuentra directamente en los suelos (campos de tiro), producirán alimentos especialmente contaminados con el metal.¹⁵⁶

- **Vías de exposición**

Como hemos indicado, una de las principales vías de exposición es la de inhalación, siendo la intoxicación aguda resultado de la inhalación de óxidos de plomo; otra vía, aún más importante, es la de absorción, a través del

¹⁵⁵ Yuan, D.; Zhou, W. y Ye, S., "Effect of leaded and unleaded gasoline on the mutagenicity of vehicle exhaust particulate matter", *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19, 2000: 41- 48.

¹⁵⁶ Braun, U.; Pusterla, N. y Ossent, P., "Lead poisoning of calves pastured in the target area of a military shooting range". *Schweiz. Arch. Tierheilkd*, 139, 1997: 403-407.

sistema digestivo, de compuestos de plomo presentes en los alimentos y en el agua proveniente de conducciones de plomo.

En cuanto a la intoxicación alimentaria por plomo, cabe destacar la provocada por vegetales cultivados en las proximidades de carreteras muy transitadas y la de los alimentos envasados en latas de conserva con soldaduras a base de aleaciones de plomo y estaño. Los plaguicidas que contienen plomo (arseniatos), contaminan de igual manera los vegetales con ellos tratados. Asimismo son vehículo de contaminación los pescados, moluscos y mariscos procedentes de aguas contaminadas.

Especial mención merecen las intoxicaciones infantiles por vía digestiva debidas a los juguetes de plomo o pinturas con colorantes plúmbicos. El contenido de plomo en pinturas no fue regulado hasta 1977, por lo que muchas estructuras antiguas, tanto comerciales como residenciales, se encuentran aún recubiertas con estos materiales, que constituyen un peligro potencial para los niños: se han descrito casos de intoxicaciones en niños de zonas urbanas deprimidas, precisamente por ingerir éstos -por su sabor dulce- restos de pintura blanca con alto contenido del metal, utilizada en la decoración de paredes de edificios antiguos.

II.6.2.c.- Toxicidad: metabolismo; mecanismos de acción. Órganos afectados

- **Toxicidad**

Tanto el plomo como sus sales y aleaciones son altamente tóxicos, mereciendo en este sentido especial mención los óxidos del metal, así como el carbonato, acetato, nitrato (el más soluble), cromato, arseniato (potente insecticida), tetrametilo y tetraetilo de plomo, (adicionados a las gasolinas para aumentar su rendimiento). De cualquier manera, la toxicidad varía con el producto, dependiendo de la solubilidad del mismo y, en último término, de su absorción.

El plomo inorgánico entra en el organismo principalmente por inhalación e ingestión, pero no es metabolizado. Por el contrario, el plomo orgánico, encontrado sobre todo en las gasolinas como tetraetilo de plomo, altamente volátil y liposoluble, entra en el cuerpo por inhalación o contacto, siendo metabolizado en el hígado. La absorción del plomo inorgánico ingerido viene a ser del orden del 10%, frente al 75% absorbido en el caso de plomo orgánico, con menos de un 5% retenido. En niños, tanto la absorción como la retención son más altas, por lo que están más expuestos a los efectos tóxicos del metal: mientras que el individuo adulto absorbe aproximadamente un 5- 10% del plomo de la dieta, en recién nacidos y niños la absorción es un 40% más eficaz. En general, la absorción es mayor a través de la vía gastrointestinal,¹⁵⁷ seguida de la

¹⁵⁷ Goyer, R.A., "Toxic effects of metals", en: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 3ª ed., C. D. Klaassen, M.O. Amdor, J. Doull y MacMillan, eds., NY, 1986: 582-635.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

pulmonar, y menor por la piel. La intoxicación crónica se presenta generalmente por la absorción de óxidos, carbonatos y otros compuestos solubles en agua a través del tracto digestivo. La intoxicación aguda por plomo inorgánico es menos frecuente y suele resultar de la inhalación de sus óxidos, de ingestión accidental o a causa de bebidas elaboradas o almacenadas en recipientes con aleaciones del metal.

La esencia de la intoxicación crónica de plomo consiste en que los síntomas se manifiestan muy lentamente y de forma no característica. El plomo consumido influye sobre determinados aminoácidos proteicos que contienen azufre; estos efectos se manifiestan mientras el plomo está ionizado.

Cuando se produce combinación, por ejemplo, con tales proteínas o con otros componentes celulares, así como en los huesos, se desioniza el ión plomo que, en consecuencia, pierde su carácter tóxico. La afinidad del plomo por los grupos sulfhidrilo de las proteínas, constituye la base del bloqueo de estas enzimas, que participan, entre otros, en los procesos de obtención de energía.

A pesar de lo anteriormente expuesto, estudios experimentales¹⁵⁸ confirman interesantes hallazgos anteriores¹⁵⁹ que demuestran que el plomo es un elemento necesario para el crecimiento y mantenimiento de la salud

¹⁵⁸ Kirchgessner, M. y Reichlmayer- Lais, A.M., *Trace element metabolism in man and animals*, en: Howell, J.Mc.C.; Gawthorne, J.M. y White, C.L., eds., Camberra: Australian Academy of Science, 1981: 390- 621.

¹⁵⁹ Schwartz, K.; Milne, D.B. y Vineyard, E., *Biochem Biophys Res Commun.*, 40, 1970: 22.

corporal.¹⁶⁰ No obstante, concentraciones elevadas de este metal afectan muy significativamente al metabolismo de los eritrocitos (lo que se refleja en la aparición de anemias), al riñón (provocando nefropatías¹⁶¹), y al cerebro. Sobre todo en niños puede producir estados de hiperexcitabilidad y diversos trastornos de la conducta,¹⁶² acompañados de notables retrasos en el desarrollo de las facultades intelectivas.¹⁶³

El nivel de plomo en sangre que se considera aceptable está por debajo de los 15 µg por decilitro. Cantidades superiores pueden ser asociadas con daños orgánicos inducidos por el metal.¹⁶⁴ El consumo de plomo es muy variable en los países occidentales y puede oscilar alrededor de los 300 µg/día.

En realidad, lo que influye en la toxicidad del plomo no es su contenido absoluto en el organismo, sino su aumento repentino. En ese caso, el equilibrio resultante, por compensación, entre el consumo o contenido de plomo en los

¹⁶⁰El primer grupo de investigadores (Kirchgessner, M. y Reichlmayer- Lais, A.M.) probó que en animales a los que se les había inducido una deficiencia de plomo, se observaban trastornos en el proceso hematopoyético que se manifestaban por una ligera anemia hipocrómica microcítica, acompañada por disminución de las reservas hepáticas y esplénicas de hierro; se detectó asimismo una reducción de la absorción intestinal de hierro, la cual podría ser la causa de las alteraciones hemáticas observadas en los animales deficientes de Pb. Los fundamentos bioquímicos de estas observaciones se desconocen en la actualidad.

¹⁶¹Weeden, R.P., "Occupational renal diseases", *Am. J. Kidney Dis.*, 3, 1984: 241.

¹⁶²Por ejemplo en el desarrollo psicomotor, como describe el trabajo de Vega, J. et al., "Chronic exposure to environmental lead in Chilean infants. II: Effects on the psicomotor development", *Rev. Med. Chil.*, 127 (1), Enero, 1999: 28- 37.

¹⁶³Koike- S., "Low level lead exposure and children's intelligence from recent epidemiological studies in the U.S.A. and other countries to progressing reducing lead exposure and screening in the U.S.A.", *Nippon- Eiseigaku- Zasshi.*, 52, 1997: 552- 561.

¹⁶⁴Piomelli, A.; Seaman, C.; Zullo, D. et al., "Threshold for lead damage to heme synthesis in urban children", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 1982: 3335; Weeden, R.P., "Blood lead levels, dietary calcium and hypertension", *Ann. Intern. Med.*, 102, 1985: 403.

órganos y los efectos biológicos de sus iones, se ve sometido a nuevos trastornos y, en consecuencia, se convierte en factor patógeno.

La acumulación excesiva de plomo en el organismo no tiene que derivar necesariamente de un aumento provocado por aportaciones exteriores, sino que también puede ser causada por movilización del plomo almacenado en los huesos -apenas tóxico- cuando, por ejemplo, se necesita repentinamente dentro del metabolismo óseo normal la liberación de calcio (en la gravidez,¹⁶⁵ la lactancia, procesos metabólicos, periodos de ayuno, etc.).

Por otra parte, existen diversos factores que contribuyen a aumentar la toxicidad del metal, como son por ejemplo la ingesta de alcohol o estados de deshidratación.¹⁶⁶ Así, se dispone de evidencia suficiente como para asegurar que el alcohol potencia los efectos neurotóxicos del plomo, al acentuar el estrés oxidativo inducido por éste en el cerebro.¹⁶⁷

¹⁶⁵ Singh, J. et al., "State of pregnancy modifies lead toxicity in mice", *Biol. Trace Elem. Res.*, 67 (3), Marzo, 1999: 205- 13.

¹⁶⁶ Así lo demuestra, por ejemplo, el trabajo de Al- Shuaib, W.B. et al., "Dehydration affects synaptic transmission at flexor muscle in acute lead- treated mice", *Cell. Mol. Biol. Noisy le grand*, 45 (4), Junio, 1999: 407- 411.

¹⁶⁷ Como prueba el trabajo de Jindal, V. y Gill, K.D., "Ethanol potentiates lead- induced inhibition of rat brain antioxidant defence systems", *Pharmacol. Toxicol.*, 85 (1), Julio, 1999: 16- 21; o el de Flora, G.J. et al., "Changes in neurotransmitter receptors and neurobehavioral variables in rats co- exposed to lead and ethanol", *Toxicol. Lett.*, 109 (1-2), Septiembre, 1999: 43- 49, que describen cambios pronunciados en la neurotoxicidad y comportamiento neurológico de animales tratados con etanol y plomo. Existen, sin embargo, otros estudios que parecen indicar que no existe sinergismo entre los efectos de ambos compuestos en el metabolismo del grupo hemo (Santos, J.L. et al., "Nonsynergic effect of ethanol and lead on heme metabolism in rats", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43 (1), Mayo, 1999: 98- 102.

- **Metabolismo. Mecanismos de acción**

Su acción es esencialmente enzimática, siendo, sobre todo, un potente reductor: se combina con diversas deshidrogenasas y anula su papel metabólico de transporte de hidrógeno celular; al alterar la actividad enzimática, perturba las rutas metabólicas de la célula (inhibición de la glicolisis). Existe evidencia suficiente que implica al estrés oxidativo en la toxicidad del plomo, al fomentar éste la formación de radicales hidroxilo, así como peroxidación lipídica.¹⁶⁸ Así, se ha comprobado que la acción de la melatonina en los cambios producidos por intoxicación por plomo es atribuible al papel de ésta en la protección de los mecanismos antioxidantes de la célula, además de su capacidad para neutralizar radicales libres.¹⁶⁹ De especial importancia son los daños oxidativos en cerebro asociados a la presencia de plomo en el organismo.¹⁷⁰

Entre las enzimas que resultan inhibidas por el plomo, según se ha comprobado, están incluidas la acetilcolinesterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina,¹⁷¹ ATPasa, anhidrasa carbónica, fructosa 1,6-difosfatasa y glutamato

¹⁶⁸ Gurer, H. et al., "Antioxidant role of alpha- lipoic acid in lead toxicity", *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (1-2), Julio, 1999: 75- 81.

¹⁶⁹ El-Missiry, M.A., "Prophylactic effect of melatonin on lead- induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 14 (1), 2000: 57- 62.

¹⁷⁰ Así lo demuestra el trabajo de Adonaylo, V.N. y Oteiza, P.I., "Lead intoxication: antioxidant defences and oxidative damage in rat brain", *Toxicology*, 135 (2- 3), Julio, 1999: 77- 85, en el que se concluye que la intoxicación crónica con Pb²⁺ induce una situación de estrés oxidativo en cerebro de rata.

¹⁷¹ Jarrar, B.M. y Mahmoud, Z.N., "Histochemical demonstration of changes in the activity of hepatic phosphatases induced by experimental lead poisoning in male white rats (*Rattus norvegicus*)", *Toxicol. Ind. Health*; 16, 2000: 7-15.

deshidrogenasa.

Se han descrito, asimismo, efectos del plomo, tanto en experimentos con vertebrados como *in vitro*, en el metabolismo del triptófano, bloqueando una de sus vías metabólicas. De igual manera produce la inhibición de una vía metabólica en el metabolismo de los nucleótidos de pirimidina, lo que provoca su acumulación en los glóbulos rojos. Además, el plomo provoca inhibición en la síntesis de proteínas, probablemente modificando el ARN de transferencia, así como una reducción reversible del ADN y ARN en cultivos celulares. Por último, cabe destacar la gran afinidad del plomo por las mitocondrias, en las que inhibe la fosforilación oxidativa.

El mecanismo de absorción utilizado es probablemente el mismo que utiliza el calcio. Una vez absorbido, el plomo se distribuye por todo el organismo, principalmente “secuestrado” por los eritrocitos: el plomo se azabuliza y pasa a la sangre en forma de albuminatos o nucleatos de plomo, como fosfato coloidal o complejos diversos. El metal se deposita, al igual que sucede con el calcio, en hígado, bazo, riñones y, de modo especial, en el esqueleto, donde se acumula en forma de trifosfato en las epífisis óseas. Estos depósitos esqueléticos son débiles, pasando nuevamente a la sangre en diversas circunstancias, por ejemplo, por alteración del pH plasmático. Dietas pobres

en fósforo, calcio y hierro, y con elevado contenido en vitamina D, aumentan la absorción de plomo.¹⁷²

El contenido total de plomo en el cuerpo se encuentra, por tanto, en dos acervos cinéticos con diferentes velocidades de recambio: el esqueleto es el acervo de mayor capacidad y con menor velocidad de recambio (vida media de 20 años), mientras que los tejidos blandos constituyen un acervo más lábil. El plomo, al igual que el calcio, forma carbonatos y fosfatos insolubles. El fluido extracelular pone en contacto el plomo con la capa de hidratación de la hidroxiapatita, permitiendo la penetración de éste hasta la superficie del cristal. Dadas las similitudes en tamaño y carga, el plomo es capaz de sustituir al calcio en la matriz de hidroxiapatita del hueso, donde, una vez depositado, no se halla irreversiblemente secuestrado, ya que puede ser liberado por intercambio iónico en la superficie de los cristales o a través de la actividad osteoclástica.

¹⁷² El exceso de plomo depositado en tejidos blandos puede desplazarse mediante la administración de agentes quelantes del metal, tales como CaNa_2EDTA (Calcio disodio etilendiamineteraacetato) (Chisolm, J.J. Jr., *Mod. Treat.*, 8 (3), Harper and Row, eds., Agosto, 1971), meso- DMSA, o penicilamina (Molina- Ballesteros et al., "Urinary ALA as a Biologic Indicator Throughout Penicillamine Therapy in Pb Intoxication", *Arch. Environ. Health.*, 33, 1978: 308); el depositado en hueso no se elimina tan fácilmente; se requiere para ello la acción de PTH o de glucocorticoides. Existen estudios recientes en animales, que indican que la S-adenosil- L- metionina, (SAM), presenta efectos beneficiosos en la prevención de alteraciones de algunas variables bioquímicas, así como en la acumulación del metal en sangre, hígado y cerebro (Flora, G.J. y Seth, P.K., "Beneficial effects of S- adenosyl- L- methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione and lipid peroxidation during acute lead- ethanol administration in mice", *Alcohol.*, 18 (2- 3), Junio- Julio, 1999: 103- 108). De igual manera, se recomienda un suplemento de ácido ascórbico como método de reducción de los niveles de plomo en sangre, al disminuir aquél la absorción intestinal del metal (Dawson, E.B. et al., "The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers", *J. Am. Coll. Nutr.*, 18 (2), Abril, 1999: 166- 170; Houston, D.K. y Johnson, M.A., "Does vitamin C intake protect against lead toxicity?", *Nutr. Rev.*, 58, 2000: 73- 75).

El plomo se elimina del organismo principalmente por vía biliar; cerca del 10-20% es eliminado por vía urinaria, que resulta ser la ruta de eliminación de Pb inorgánico más importante.¹⁷³ Dos tercios del plomo orgánico son excretados vía heces.

- **Órganos afectados**

- 1.- Sistema hematopoyético

Los efectos más comunes del plomo se reflejan en el sistema hematopoyético, especialmente en personas expuestas laboralmente, y se presentan principalmente como una intoxicación crónica. De esta manera, uno de los síntomas generales de la intoxicación crónica por plomo es la anemia microcítica e hipocrómica por desórdenes del metabolismo de la porfirina.¹⁷⁴

¹⁷³ Según el estudio de Kostial, K. et al., "Combined chelation therapy in reducing tissue lead concentrations in suckling rats", *J. Appl. Toxicol.*, 19 (3), Mayo- Junio, 1999: 143- 147, el meso-DMSA (ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico), que incrementa la excreción urinaria del metal, sería el tratamiento más recomendable en el caso de intoxicaciones infantiles agudas, opinión que no corrobora el trabajo de Chisolm, J.J., Jr., "Safety and efficacy of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) in children with elevated blood lead concentrations" *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*; 38, 2000: 365- 375, ni el de Cremin, J.D. Jr.; Luck, M.L.; Laughlin, N.K. y Smith, D.R., "Efficacy of succimer chelation for reducing brain lead in a primate model of human lead exposure", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 161, 1999: 283- 293.

¹⁷⁴ La determinación de porfirinas en células rojas constituye un importante indicador de la exposición crónica al metal, principalmente la de la protoporfirina IX (eritrocitaria libre o FEP) o la del complejo que forma con el zinc, la ZPP (Karacic, V., et al., "The Relationship between Zinc Protoporphyrin (ZPP) and "free" Erythrocyte Protoporphyrin (FEP) in lead- exposed individuals", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 47, 1980: 165- 177), que reflejan con gran precisión la exposición sufrida por el sujeto a lo largo del tiempo. Los primeros trabajos al respecto se deben a Alessio, L. et al., "Free erythrocyte protoporphyrin as an indicator of the biological effect of lead in adult males: I. Relationship between free erythrocyte protoporphyrin and indicators of internal dose of lead", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37, 1976: 73- 88. Posteriormente otros equipos de investigadores han profundizado en el tema, como es el caso de Peter, F. et al., "Fluorometric Determination of Erythrocyte Protoporphyrin in Blood, a Comparison between Direct (Hematofluorometric) and Indirect (Extraction) Methods", *Clin. Chem.*, 24 (9), 1978: 1515- 1517, o Suga, R. S. et al., "Establishment of normal values in adults for zinc protoporphyrin (ZPP) using hematofluorometer: correlation with normal blood lead values", *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 42 (9), 1981: 637- 642.

El plomo actúa impidiendo la formación de la hemoglobina, al producir inhibición de las enzimas δ -aminolevulínico deshidrogenasa, uroporfirinógeno sintetasa y ferroquelatasa (enzima que “coloca” el ión Fe^{2+} en el anillo porfirínico), responsables de la síntesis del grupo hemo y la globina, lo que explica la anemia provocada por el metal.¹⁷⁵ Por otra parte, ciertas ATPasas resultan inhibidas por el exceso de Pb corporal, lo que acelera la pérdida de sodio en el eritrocito al alterar el flujo de la bomba sodio/potasio, disminuyendo los niveles de ATPasas Na^+/K^+ -dependientes y, al menos *in vitro*, la respiración mitocondrial se ve intensamente reducida. Se produce, asimismo, una concentración excesiva de plomo en los glóbulos rojos, lo que muy posiblemente contribuye a aumentar la fragilidad eritrocitaria, disminuyendo el tiempo de vida de los eritrocitos.¹⁷⁶

El mecanismo por el que el metal inhibe la síntesis del grupo hemo parece envolver, al menos, dos enzimas: una citoplasmática, la δ -ácido

¹⁷⁵ La determinación de los niveles de ácido δ -aminolevulínico deshidrogenasa (ALA-D), es el indicador más sensible en la evaluación de los efectos primarios provocados por la absorción del plomo sobre la hemosíntesis; así lo demuestran diversos estudios, como el llevado a cabo por Díaz González, M., et al., “Estudio epidemiológico de niveles de plomo y otros parámetros en una población infantil urbana industrial y su comparación con la de una zona rural”, *Salud y trabajo*, 33, Octubre, 1981: 96- 102, siempre y cuando se limite su uso a niveles más bien bajos de exposición (plumbemias de hasta 35 a 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$), ya que la correlación encontrada en este rango de niveles es buena y significativa, como prueba el trabajo de Granick, J. L. et al., “Studies in lead poisoning II. Correlation between the ratio of activated to inactivated delta-aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level”, *Biochem. Med.*, 8, 1973: 149- 159, o el de Chisolm, J. J. Jr., “Heme Metabolites in Blood and Urine in Relation to Lead Toxicity and their determination”, en: *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 20, Academy Press, ed. 1978: 238.

¹⁷⁶ Patra, R.C. y Swarup, D., “Effect of lead on erythrocytic antioxidant defence, lipid peroxide level and thiol groups in calves”, *Res. Vet. Sci.*, 68, 2000: 71- 74.

aminolevulínico- deshidrogenasa (ALA-D), activa al principio del proceso de síntesis, y una mitocondrial, la ferroquelatasa, activa al final del proceso. La ALA-D permanece activa en las células rojas circulantes, pero la actividad de la ferroquelatasa desaparece tan pronto como el eritrocito se pone en circulación, al tiempo que desaparecen las mitocondrias en la célula.¹⁷⁷

2.- Sistema nervioso

El plomo produce efectos, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, que varían según se trate de plomo inorgánico u orgánico. El metabolismo del plomo orgánico en el hígado, que libera plomo inorgánico, y el subsiguiente transporte de éste al órgano crítico, el cerebro, parece ser el responsable de los efectos neurotóxicos del metal. La neurotoxicidad de los compuestos orgánicos de plomo se debe a variaciones en la distribución de cloruro/hidróxido a lo largo de la membrana de la célula nerviosa, resultado de la inducción de intercambio aniónico. La alteración de la función motriz que se presenta en las intoxicaciones por el metal es imputable a la disminución de la velocidad de conducción motriz de las fibras (incluso a concentraciones subclínicas de Pb), a la degeneración de las células de Schwann (desmielinización segmentaria), a una posible

¹⁷⁷ Baranowska- Bosiacka, I.; Hlynczak, A.J. y Machalinski, B., "The impact of lead ions on metabolism of erythrocytes", *Med. Pr.*, 51, 2000: 59-65.

degeneración axonal y a la degeneración de las raíces posteriores de los nervios tibial y ciático.¹⁷⁸

Los efectos de los compuestos inorgánicos sobre el sistema nervioso central se manifiestan en encefalopatías por exposición crónica o subcrónica, caracterizadas por torpeza, embotamiento, irritabilidad, cefalalgias, pérdida de la capacidad intelectual, temblor muscular, y alucinaciones.¹⁷⁹ La encefalopatía debida a una absorción de plomo orgánico (tetraetil-plomo) presenta los síntomas de alucinaciones, insomnio, delirio, etc, pudiéndose confundir con un problema psiquiátrico.¹⁸⁰ Los efectos sobre el sistema nervioso periférico dan lugar a debilidad de los músculos exteriores, alterándose la función motriz por disminución de la velocidad de conducción motriz de las fibras.

3.- Sistema renal¹⁸¹

Las células epiteliales de la nefrona parecen especialmente sensibles a la intoxicación por plomo: en esa situación se produce una disminución de

¹⁷⁸ Jensen, A.A., "Metabolism and Toxicokinetics", en: *Biological Effects of Organolead Compounds*, ed. P. Grandjean, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984: 97- 116.

¹⁷⁹ En el trabajo de Gilbert, M.E. et al., "The influence of developmental period of lead exposure on long- term potentiation in the adult rat dentate gyrus in vivo", *Neurotoxicology*, 20 (1), Febrero, 1999: 57- 69, se expone cómo el efecto del Pb en la función sináptica, puede contribuir a los déficits cognitivos asociados con la intoxicación.

¹⁸⁰ Así, el estudio de Delville, Y., "Exposure to lead during development alters aggressive behaviour in golden hamsters", *Neurotoxicol. Teratol.*, 21 (4), Julio- Agosto, 1999: 445- 449, describe cómo la exposición temprana a bajas dosis de plomo durante el desarrollo, pueden acentuar el comportamiento agresivo en animales macho.

¹⁸¹ Madden, E.F. y Fowler, B.A., "Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review", *Drug. Chem. Toxicol.*, 23, 2000: 1-12.

la reabsorción tubular de glucosa y aminoácidos, con la consiguiente aminoaciduria, hipofosfatemia y glucosuria. También la conversión, en tejido renal, de 25-OH colecalciferol en 1,25-diOH colecalciferol (vitamina D activa) está inhibida en individuos con niveles anormalmente altos de Pb corporal.¹⁸² Por otra parte, en sujetos con patología hipertensiva causada por lesión renal se ha observado un aumento de la concentración corporal total de Pb, lo que constituye un dato analítico que asocia toxicidad por plomo e hipertensión renal.¹⁸³

Un primer efecto de la intoxicación por plomo es, como indicábamos, la lesión tubular renal, siendo las células del túbulo proximal del riñón las más afectadas; se produce una alteración de la reabsorción de glucosa, aminoácidos y fosfato. Estos efectos son reversibles y el enfermo puede recuperarse si la contaminación no es muy continuada. Si la exposición al plomo se produce durante un tiempo prolongado, se manifiesta una restringida fase de efectos irreversibles, caracterizada por alteraciones graves en el epitelio tubular, aumento gradual del tejido fibroso intersticial y atrofia de las células tubulares. Como consecuencia se llega a una grave insuficiencia renal.

¹⁸² Mahaffey, K.R. et al., "National estimates of blood lead levels: United States, 1976-1980", *N. Engl. J. Med.*, 307 (10), 1982: 573- 579.

¹⁸³ Tsao, D.A.; Yu, H.S.; Cheng, J.T.; Ho, C.K. y Chang, H.R., "The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 164, 2000: 127- 133.

4.- Efectos sobre el sistema inmune

Tanto el acetato como el nitrato de plomo han demostrado tener efectos inmunotóxicos (inmunodepresores), con afección generalizada de la producción de anticuerpos timo-dependientes, blastogénesis linfocitaria, incremento del crecimiento del tumor vírico, descenso de macrófagos y disminución en la producción de interferón. Asimismo se comprueba una disminución en las concentraciones de inmunoglobulina sérica en intoxicaciones por plomo, imputadas al estrés oxidativo que el metal produce;¹⁸⁴ no obstante, no presenta efectos sobre la actividad de las denominadas “células asesinas”.

Se ha observado, en áreas con altos niveles de contaminación, gran número de casos de asma infantil y otras enfermedades, que han sido atribuidas a la transferencia de plomo de la madre al feto, tanto a través de la barrera placentaria, como durante el periodo de lactancia, afectando al sistema inmune.¹⁸⁵ En resumen, los resultados de múltiples estudios indican que el metal induce cambios en los mecanismos de inmunoregulación,¹⁸⁶ con consecuencias clínicas potencialmente severas

¹⁸⁴ Ercal, N.; Neal, R.; Treeratphan, P.; Lutz, P.M.; Hammond, T.C.; Dennerly, P.A. y Spitz, D.R., “A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats”, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 39, 2000: 251- 256.

¹⁸⁵ Snyder, J.E.; Filipov, N.M.; Parsons, P.J. y Lawrence, D.A., “The efficiency of maternal transfer of lead and its influence on plasma IgE and splenic cellularity of mice”, *Toxicol. Sci.*; 57, 2000: 87-94.

¹⁸⁶ Krocova, Z.; Macela, A.; Kroca, M. y Hernychova, L., “The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro”, *Toxicol. Vitr.*; 14, 2000: 33-40.

promovidas por el metal.¹⁸⁷

5.- Efectos carcinogénicos y genotóxicos

El plomo ha sido clasificado como carcinógeno, pero la evidencia es más adecuada para animales que para humanos. En poblaciones expuestas a plomo sólo se ha encontrado un ligero aumento en la incidencia del cáncer, lo que no permite una generalización directa para el Hombre.

Una severa exposición a plomo causa esterilidad y abortos, además de un aumento de la mortalidad neonatal. Se han observado efectos gametotóxicos, tanto en machos como en hembras de animales,¹⁸⁸ habiendo sido descritas aberraciones cromosómicas y morfologías anormales de los espermatozoides en humanos debidas al efecto del plomo.¹⁸⁹

¹⁸⁷ Un posible mecanismo de acción del plomo en la respuesta inflamatoria e immuno-modulación es propuesto en el trabajo de Armes, G.T. et al., "Lead activates nuclear transcription factor-kappa B, activator protein-1, and amino-terminal C-Jun kinase in pheochromocytoma cells", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 155 (3), Marzo, 1999: 280- 286.

¹⁸⁸ Al-Omar, M.A.; Abbas, A.K. y Al-Obaidy, S.A., "Combined effect of exposure to lead and chlordane on the testicular tissues of Swiss mice", *Toxicol. Lett.*, 115, 2000: 1-8.

¹⁸⁹ Wadi, S.A. y Ahmad, G., "Effects of lead on the male reproductive system in mice", *J. Toxicol. Environ. Health*, 56 (7), Abril, 1999: 513- 521, describen la espermatogénesis testicular, y el espermatozoide como dianas del plomo, de manera que éste ocasiona la toxicidad reproductiva mediante estos mecanismos, sin afectar aparentemente a otros puntos del eje hipotálamico- pituitario- testicular. Sin embargo, Foote, R.H., "Fertility of rabbit sperm exposed in vitro to cadmium and lead", *Reprod. Toxicol.* 13, 1999: 443-449, encuentra poco significativa la diferencia de fertilidad entre el grupo control y el tratado con plomo, máxime teniendo en cuenta que las concentraciones de metal utilizadas superan, con mucho, las observadas en trabajadores expuestos.

En cuanto a posibles daños sobre el material genético, como ya se ha señalado, no obstante no participar directamente en las rutas carcinógenas, los compuestos de este metal pueden inducir estrés oxidativo¹⁹⁰ por peroxidación lipídica,¹⁹¹ bien uniéndose y bloqueando el glutatión, bien inhibiendo ciertas enzimas antioxidantes como la GSH-peroxidasa. Se ha demostrado que determinadas sales de plomo puede unirse a grupos SH, inhibiendo de esta manera los mecanismos de reparación del ADN en células humanas.¹⁹² Evidentemente, la inhibición del sistema reparador del ADN¹⁹³ puede jugar un papel incluso más importante en los procesos de carcinogénesis que la participación directa en ellos.¹⁹⁴ Como posibles mecanismos de esta inhibición se ha postulado tanto una interacción con enzimas reparadores, como una interacción con procesos regulados por calcio. En efecto, el acetato de calcio previene el efecto carcinógeno de los compuestos de plomo, lo que indica que el plomo debe resultar sustituido por Ca (II) en la calmodulina calcio-específica, estimulando la proteína-kinasa calcio-dependiente.¹⁹⁵ Dicha proteína-kinasa C,¹⁹⁶ que resulta estimulada por concentraciones

¹⁹⁰ Ariza, M.E. y Williams, M.V., "Lead and mercury mutagenesis: type of mutation dependent upon metal concentration", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 13 (2), 1999: 107-112.

¹⁹¹ Ding, Y.; Gonick, H.C. y Vaziri, N.D., "Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells", *Am. J. Hypertens.*, 13, 2000: 552-555.

¹⁹² Hartwig et al., "Indirect mechanism of lead- induced genotoxicity in cultured mammalian cells", *Mutat. Res.*, 241, 1990: 75- 82.

¹⁹³ Medvedev, A.I.; Chernikov, A.V.; Kublik, L.N. y Revina, G.I., "The effect of lead on DNA repair in thymocytes of gamma-irradiated mice", *Radiats. Biol. Radioecol.*, 40, 2000: 81- 85.

¹⁹⁴ Snyder, R.D. y Lachmann, P.J., "Thiol involvement in the inhibition of DNA repair by metals in mammalian cells", *Mol. Toxicol.*, 2, 1989: 117- 128.

¹⁹⁵ Magos, L., "Epidemiological and experimental aspects...", op. cit., 157- 189.

¹⁹⁶ Jadhav, A.L.; Ramesh, G.T. y Gunasekar, P.G., "Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb²⁺-induced cytotoxicity", *Toxicol. Lett.*, 115, 2000: 89-98.

picomolares de plomo,¹⁹⁷ es un receptor de promotores tumorales como los ésteres de forbol, capaces de estimular la formación de especies activas del oxígeno, induciendo con ello la rotura de bandas de ADN.¹⁹⁸

II.6.3.- EL HIERRO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, METABÓLICOS Y CLÍNICOS

II.6.3.a.- Caracterización: propiedades físico-químicas. Presencia en el medio

Elemento químico perteneciente al grupo VIII del Sistema Periódico de los Elementos. Su símbolo es Fe, y sus características, como elemento del grupo, las siguientes: número atómico = 26; peso atómico = 55,85; densidad = 7,78 g/cm³; punto de fusión = 1.535 °C; punto de ebullición = 3.000 °C; valencia = +2 ó +3, aunque algunas veces puede actuar como hexavalente.

El hierro es uno de los metales más abundantes en la naturaleza, constituyendo el 4,7% de la corteza terrestre conocida. Se puede encontrar nativo en algunas pizarras y basaltos en forma de nódulos, así como combinado con

¹⁹⁷ Markovac, J. y Goldstein, G.W., "Picomolar concentration of lead stimulate brain protein-kinase C", *Nature*, 334, 1998: 71- 73; Sun, X. et al., "Analysis of differential effects of Pb²⁺ on protein kinase C isozymes", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(1), Abril, 1999: 40- 45; Chen, H.H. et al., "Protein kinase C in rat brain is altered by developmental lead exposure", *Neurochem. Res.*, 24 (3), Marzo, 1999: 415- 421.

¹⁹⁸ Birnboim, H.C., "DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumour promoter, phorbol myristate acetate", *Science*, 215, 1982: 1247- 1249; Shacter, E. et al., "DNA damage induced by phorbol ester – stimulated neutrophils is augmented by extracellular cofactors. Role of histidine and metals", *J. Biol. Chem.*, 265, 1990: 6693- 6699; Witz, G., "Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 198, 1991: 675- 682.

otros elementos, dando lugar a minerales oxidados de hierro: hierro oligisto o hematites roja (óxido férrico), hierro magnético o magnetita (óxido ferroso-férrico), limonita (hidróxido férrico), hierro espático o siderita (carbonato de hierro). Son, de igual manera, muy abundantes otras combinaciones de este elemento, como la pirita de hierro, pirita magnética o pirrotina, calcopirita, etc.

Presenta notables aplicaciones industriales, habiendo sido también utilizado en la fabricación de fuegos artificiales, aunque en nuestro caso el interés que reviste obedece a sus funciones fisiológicas y sus características paramagnéticas.

Se trata del elemento con más amplia gama de funciones fisiológicas, merced a su participación en la estructura de gran número de moléculas con actividades esenciales en el organismo.

- **Ubicación del hierro en los organismos**

En los vegetales el hierro se asocia a las enzimas de los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, dado que las plantas carecen de pigmentos transportadores de oxígeno; sin embargo, una parte del hierro no hemo se almacena en las hojas en forma de fosfoproteína-Fe^(III) (fitoferrina) y se transporta como un quelato de citrato-Fe^(III).

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

En el organismo humano el hierro es el elemento mineral más abundante (50 mg/kg en el hombre, 37 mg/kg en la mujer), después del calcio y el fósforo. Aproximadamente 2/3 del hierro corporal se localizan en la hemoglobina de los eritrocitos; también la mioglobina y varios otros enzimas contienen hierro. La ferritina y su agregado, la hemosiderina, constituyen las sedes de depósito del hierro, encontrándose en el sistema reticuloendotelial, en los hepatocitos y, en menor medida, en los músculos. A su vez, la transferrina es la proteína plasmática encargada del transporte en los intercambios de hierro entre sus depósitos y las sedes activas.

La cantidad de hierro total del organismo humano se sitúa entre 4 y 5 gramos. Las tres cuartas partes de ese hierro, como señalábamos anteriormente, están unidas a la *hemoglobina*, cuya concentración aproximada en sangre es del orden de 14 gramos en cada 100 ml. Esta proteína presenta cuatro átomos de Fe por molécula, y representa el 73% del contenido total de hierro del cuerpo humano. En el músculo hay mioglobina en una concentración aproximada de 1 g/Kg, con un átomo de Fe por molécula, que representa entre el 3,3 y el 5% del contenido total de hierro del organismo. El resto, del 15 al 17%, se almacena principalmente como ferritina, ubicada en todas las células para la protección de las funciones celulares frente a los radicales libres, no sólo del oxígeno, sino también de otros compuestos como lípidos y carbohidratos.

A pesar de que en la Naturaleza se halla, fundamentalmente, en la especie química férrica, $\text{Fe}^{(\text{III})}$, en el ser humano se encuentra en sus dos formas, $\text{Fe}^{(\text{II})}$ y $\text{Fe}^{(\text{III})}$, actuando como par redox $\text{Fe}^{(\text{II})} \longleftrightarrow \text{Fe}^{(\text{III})}$ en los grupos prostéticos de los citocromos, y en forma de hidróxido férrico, $(\text{OH})_3\text{Fe}$, en la molécula de ferritina. Sin embargo, la forma $\text{Fe}^{(\text{III})}$ de los alimentos debe pasar a $\text{Fe}^{(\text{II})}$ para poder absorberse en la luz intestinal y pasar al torrente circulatorio, desde donde se distribuye por todos los tejidos y órganos sistémicos.¹⁹⁹

Las principales funciones del hierro en el ser vivo son:

- a) Transportar oxígeno a través de la sangre y en el propio tejido muscular.
- b) Intervenir en los procesos redox que tienen lugar en las reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria, y que posibilitan la fosforilación oxidativa del ADP a ATP.

II.6.3.b.- *Metabolismo: dinámica del hierro en el organismo*

Para el buen funcionamiento fisiológico y bioquímico del organismo humano se necesitan varias especies químicas importantes: especies con átomos de azufre (grupos tiólicos: $-\text{SH}$), grupos que ligan átomos de hierro en las

¹⁹⁹ La homeostasis del hierro es un proceso altamente regulado y depende en parte de las reservas corporales del mismo, estando controlada mucho más por la absorción que por la excreción del catión, como señala el trabajo de McLaren, G.D.; Muir, W.A. y Kellermeyer, R.W., "Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis, and therapy". *CRC. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 19, 1981: 205- 266; o el de Flanagan, P.R., "Intestinal iron absorption and metabolism", en: *Iron transport and storage*, Ponka, P.; Schulman, H.M. y Woodworth, R.C., eds., CRC, Boca Raton, 1990: 247- 261.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

proteínas (proteínas semejantes a la ferredoxina) y grupos prostéticos de porfirina-hierro, análogos a los citocromos de la cadena respiratoria. Todos ellos son grupos activos o moléculas con gran afinidad por el hierro. Estos grupos son eslabones de pequeñas proteínas, distribuidos en los complejos I a IV de la cadena de transporte electrónico ubicada en la mitocondria, y que funcionan en ella generando la energía necesaria para el mantenimiento de la vida.²⁰⁰

Como se ha señalado, en el organismo el hierro se halla en las células y en sus líquidos biológicos en dos estados de oxidación estable: forma ferrosa reducida ($\text{Fe}^{(II)}$) y forma férrica oxidada ($\text{Fe}^{(III)}$). Este hecho tiene una importante significación fisiológica en las secuencias de reacciones bioquímicas, desde la degradación oxidativa de los alimentos hasta el flujo electrónico (fosforilación oxidativa) que proporciona, como ya se ha indicado, la energía (ATP) necesaria a los procesos vitales. El $\text{Fe}^{(II)}$ va perdiendo electrones como agente reductor mientras que el $\text{Fe}^{(III)}$ los va ganando como agente oxidante. Actúa, por tanto, como componente activo de las enzimas antes mencionadas, por la generación de ATP durante el paso de los electrones desde cofactores redox reducidos ($\text{NADH}+\text{H}^+$: potencial redox desde -320 mV), hasta el oxígeno (O_2 , con un potencial redox de +820 mV).

²⁰⁰ Bezkorovainy, A. y Rafelson, M.E. Jr., *Concise biochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.

El hierro procedente de los alimentos se absorbe como hierro inorgánico soluble (en el caso de los vegetales) o como hierro del grupo hemo²⁰¹ de la carne, a través de la mucosa del tubo digestivo, sobre todo del intestino delgado. Una vez absorbido se transforma en hierro férrico, depositándose en cantidad relevante en las células de la mucosa en forma de ferritina. A dosis muy elevadas de hierro, parte de esta ferritina pasa a la circulación general, donde el hierro liberado, en su forma férrica y de manera reversible, se une a la transferrina, mientras otra parte se deposita en hígado y bazo. La liberación del hierro depende de los receptores celulares específicos de la transferrina²⁰² existente en varios tejidos que controlan el recambio plasmático, así como de la regulación de la absorción del metal por la mucosa intestinal.²⁰³

El reparto de hierro por los tejidos se lleva a cabo, generalmente, por receptores de endocitosis,²⁰⁴ disociándose la transferrina y el complejo receptor en un compartimento acidificado endosomal²⁰⁵ y almacenándose por último el hierro en forma de ferritina.

²⁰¹ El hierro del grupo hemo es absorbido más eficazmente que el hierro inorgánico. El pH ácido, a su vez, aumenta la absorción de Fe, facilitando su quelación con la vitamina C (ácido ascórbico), aminoácidos, azúcares y bilis, ya que la mucosa duodenal es la zona donde mejor se absorbe el Fe, transfiriéndose a la sangre.

²⁰² El trabajo de Fleming, R.E.; Migas, M.C.; Holden, C.C.; Waheed, A.; Britton, R.S.; Tomatsu, S.; Bacon, B.R. y Sly, W.S., "Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary haemochromatosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, ISS 5, 2000: 2214-2219, estudia el papel de los receptores de transferrina en la captación de Fe por el hígado en estados patológicos debidos a un exceso del metal.

²⁰³ Véase, al respecto, el trabajo de Aisen, P., "Entry of iron into cells: a new role for the transferrin receptor in modulating iron release from transferrin". *Ann. Neurol.*, 32, 1992: 62- 68.

²⁰⁴ Andrews, N.C.; Fleming, M.D. y Gunshin, H., "Iron transport across biologic membranes", *Nutr. Rev.*, 57, ISS 4, 1999: 114-123.

²⁰⁵ Ferreira, G.C.; Franco, R.; Lloyd, S.G.; Moura, J.J. y Huynh, B.H., "Structure and function of ferroxidase", *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27 (2), Abril, 1995: 221-229.

La cantidad de hierro que penetra en la célula depende del número de receptores activos de transferrina de la superficie celular. Solamente los hepatocitos y las células del Sistema Mononuclear Fagocítico pueden captar hierro por vías alternativas. Esto permite afirmar que la cuantía de hierro que penetra en la célula depende del número de receptores de transferrina de su superficie, y éstos a su vez de la cantidad de quelatos de hierro en el interior de la célula. Sólo las células que se encuentran en actividad expresan receptores de transferrina, mientras que las que están en reposo no lo hacen, a excepción de los reticulocitos, las células placentarias y las células endoteliales del encéfalo, que necesitan una síntesis continua de hemoglobina, el paso del hierro a la circulación fetal o el paso al sistema nervioso central, respectivamente.

La entrada del hierro al precursor eritrocítico se realiza mediante una forma especial de pinocitosis denominada rofeocitosis. El complejo transferrina-receptor se interioriza en una vacuola que libera posteriormente el hierro. La transferrina es expulsada nuevamente al exterior, incorporándose al pool circulante. Una vez en el interior de la célula, el hierro se une a la apoferritina que lo transporta a la mitocondria, donde se incorpora a la protoporfirina IX por acción de la ferroquelatasa, formándose así el grupo hemo.²⁰⁶ La molécula de hemo sale al citoplasma donde se asocia a las cadenas de globina para constituir la hemoglobina. Las rutas del hierro en el enterocito se reflejan en la figura 5.

²⁰⁶ Peters, T.J.; Raja, B.K. y Simpson, R.J., "Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 189, 1989: 141.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

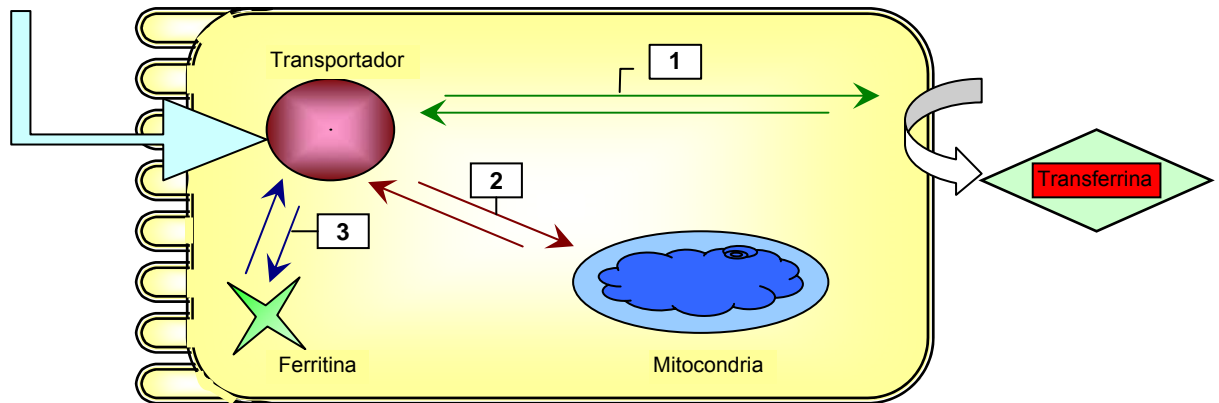


Fig. 5.- Rutas del Fe en el enterocito: 1) Transferencia del Fe al plasma desde un transportador. 2) Transferencia del Fe a la mitocondria para la síntesis del grupo hemo. 3) Incorporación del Fe a la ferritina (de: Jacobs, A., *Clin Haematol.*, 2, 1973: 323).

Existe una pequeña cantidad de hierro que no se une a la proteína y va al citoplasma o, en caso de anemias sideroblásticas, queda almacenado en la mitocondria en forma de ferritina o hemosiderina, dando lugar así a los llamados sideroblastos que, una vez diferenciados a eritrocito circulante (siderocito), y en su paso por el bazo, pierden el pequeño depósito de hierro gracias a la acción de los macrófagos allí existentes.

La anteriormente mencionada ferroquelatasa es una enzima asociada a la membrana interna de la mitocondria en las células eucarióticas. Los valores de ferroquelatasa disminuyen en todos los tejidos de pacientes con protoporfiria. Recientemente se ha identificado un grupo (2Fe-2S) que es común a todas las ferroquelatasas de mamíferos.²⁰⁷

²⁰⁷Patino, M.M. y Walden, W.E., "Cloning of a functional cDNA for the rabbit ferritin mRNA repressor protein. Demonstration of a tissue-specific pattern of expression", *J. Biol. Chem.*, 267, 1992: 19011.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Dos tercios de la fracción de hierro no absorbida son excretados por las heces y un tercio por la orina y células cutáneas descamadas. En caso de sobrecarga del metal, aumenta la fracción eliminada por la orina, aunque la presencia de hierro en orina, incluso por graves intoxicaciones, no es significativa. El nivel plasmático normal del ión está comprendido entre 0,4 y 1,8 $\mu\text{g/mL}$ (con extremos de 0,27 hasta 2,93 y una media de 1,23 $\mu\text{g/mL}$).²⁰⁸

En la figura 6 se refleja la dinámica del hierro en el organismo:²⁰⁹ la transferrina, proteína transportadora del hierro, traslada al día 35 mg del mismo. La médula eritropoyética utiliza 24 mg, de los cuales 15 mg llegan, vía hemoglobina intraeritrocitaria, al sistema mononuclear fagocitario (SMF). Otros 7 mg llegan al mencionado sistema como Fe-transferrina procedente de la eritropoyesis ineficaz. 2 mg más se liberan en la médula, durante la extrusión del núcleo de los eritroblastos ortocromáticos, constituyendo la hemoglobina que, unida a la haptoglobina y a la hemopexina, llega al hígado.

En el SMF se procesan 22 mg de Fe formando ferritina, pero liberándolos unidos a transferrina. El hígado libera 5 mg de hierro, de los cuales 3 mg proceden del total de transferrina y 2 mg de la médula eritropoyética. Al músculo y otros órganos se transportan 2 mg, que cada 24 horas son devueltos al total de transferrina. Por último la transferrina transporta 1 mg de hierro procedente de la

²⁰⁸ Baselt, R.C., "Disposition of toxic drugs and chemicals in man", *Biomedical Publ.*, Davis, Cal., USA, 2ª ed., 1982; Wirth, W.; Hacht, G. y Gloxuber, C., *Toxikologie Fibel*, 2ª ed. Thieme, Stuttgart, 1971.

²⁰⁹ Díaz- Rubio, M. y Espinós, D., *Tratado de Medicina Interna*, Ed. Panamericana; 1, 1992: 880-887.

absorción intestinal.

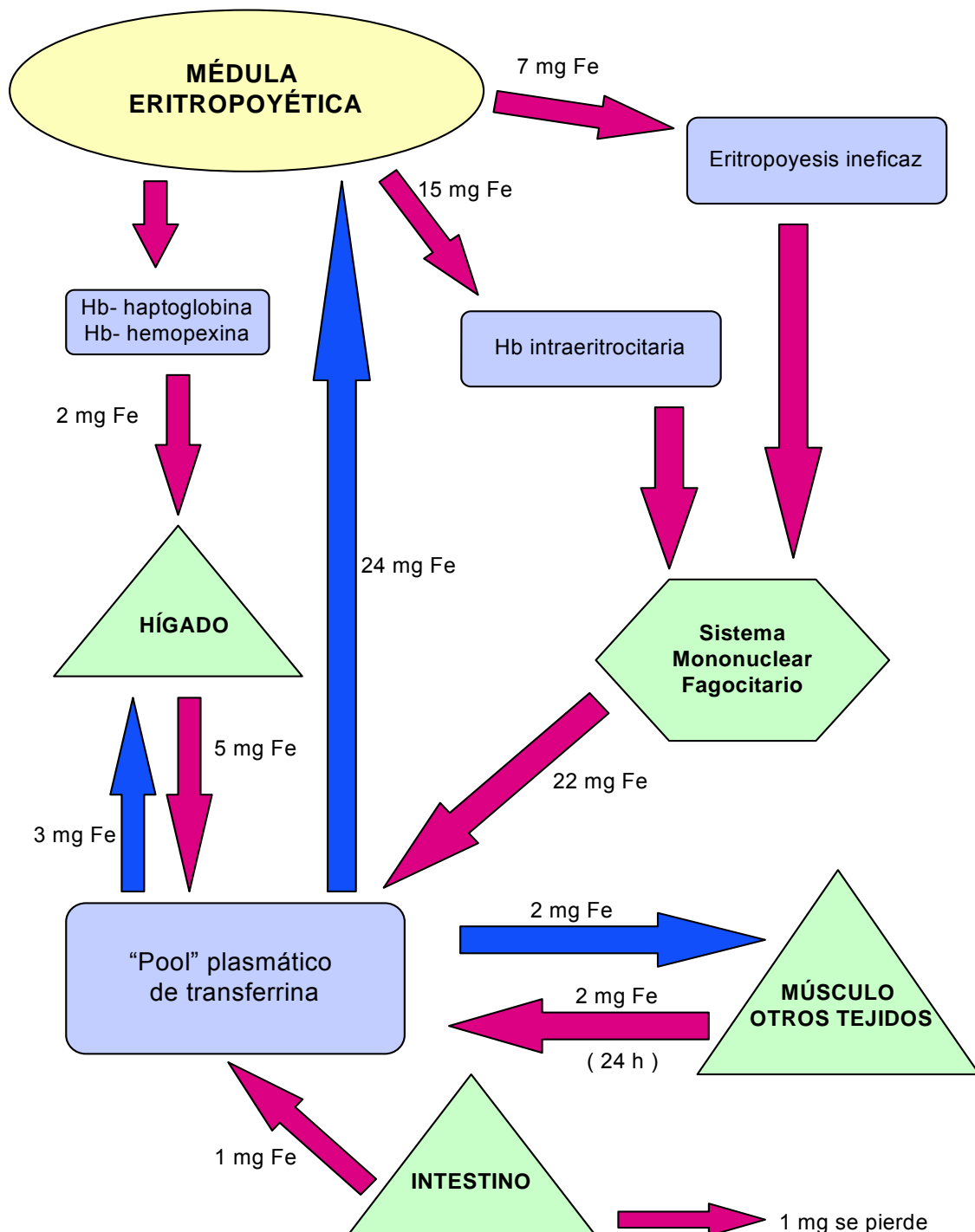


Fig.6: Dinámica del hierro en el organismo. Por: Díaz- Rubio, M. y Espinós, D., *Tratado de Medicina Interna*. Vol. 1, pág. 881. Ed. Panamericana. 1994.

II.6.3.c.- Toxicidad. Mecanismos de acción

El hierro elemental, al igual que el oxígeno molecular, es altamente tóxico para el cuerpo humano, a pesar de ser ambos esenciales para la vida. La acumulación excesiva de hierro por inhalación, ingestión o predisposición genética, induce efectos tóxicos en la función celular. La sobrecarga de hierro (siderosis) se caracteriza por altos niveles de ferritina y hemosiderina séricas, así como por peroxidación lipídica catalizada por el metal.

No obstante ser la acumulación de hierro menos frecuente que la deficiencia corporal del elemento, lleva aparejadas lesiones importantes en hígado, corazón y páncreas, afectando, posiblemente, otros órganos.²¹⁰

La toxicidad del hierro se puede dividir en dos categorías:

1. Toxicidad corrosiva: el Fe es extremadamente corrosivo para el tracto gastrointestinal; actúa sobre los tejidos de la mucosa, manifestándose en hematemesis y diarrea.

²¹⁰ La sobrecarga de hierro no es siempre debida a una ingesta excesiva del elemento en la dieta. Se han descrito dos tipos de sobrecarga corporal de hierro: hemocromatosis genética, y hemocromatosis adquirida. En estos trastornos se produce una acumulación de hierro en las células parenquimatosas de diversos órganos sistémicos (hígado, bazo, páncreas, corazón, y en glándulas endocrinas como la hipófisis, tiroides y gónada), que da lugar a lesiones físicas y alteraciones funcionales, entre las que cabe destacar la cirrosis hepática, fallo cardíaco y diabetes (por lesión pancreática), pérdida de libido y hasta impotencia; esto último es tema de estudio de los equipos de Fisher, N.C. y Daggett, P.R., "Haemochromatosis presenting with loss of libido and impotence". *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8, 1996: 705- 707; y Lucesoli, F.; Caligiuri, M.; Roberti, M.F.; Perazzo, J.C. y Fraga, C.G., "Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload", *Arch. Biochem. Biophys.*, 372, ISS 1, 1999: 37-43.

2. Toxicidad celular: la sobrecarga de hierro puede llegar a provocar la muerte celular por daños en el normal funcionamiento de las mitocondrias y una anormal fosforilación oxidativa.

La toxicidad del hierro viene determinada por la tasa de absorción del mismo en el organismo, siendo influenciada dicha toxicidad por los niveles de cobre, fósforo y vitamina E;²¹¹ los factores que aumentan la tasa de absorción del hierro son la presencia de azúcar, aminoácidos, (valina e histidina), ácido ascórbico (en presencia o ausencia de vitamina E), succinato, ácido pirúvico y ácido cítrico. Por el contrario, su solubilidad disminuye en presencia de carbonatos, oxalatos, fosfatos, citratos y tanatos, con los que forma quelatos insolubles.²¹² Otros quelatos se forman con haptoglobina, ceruloplasmina, lactoferrina, ferritina y ácidos nucleicos. Cuando la capacidad total de estos compuestos de ligar hierro se satura, el metal es ligado inespecíficamente por la albúmina y otras proteínas séricas, induciendo intoxicación.

Como ya hemos señalado, en caso de una absorción excesiva de hierro, el organismo sintetiza mayores cantidades de ferritina a fin de almacenar este exceso. Esta proteína es especialmente abundante en el corazón y el hígado, por

²¹¹ Hill, G.M.; Link, J.E.; Meyer, L. y Fritsche, K.L., "Effect of vitamin E and selenium on iron utilization in neonatal pigs", *J. Anim. Sci.*, 77, ISS 7, 1999: 1762-1768.

²¹² Así, en caso de intoxicación por hierro, se recomienda un tratamiento con compuestos quelantes, como la desferrioxamina (DFO) que, en el caso de las intoxicaciones por hierro, es el más utilizado, capaz de quelar entre 30 y 70 mg de hierro por día; no obstante, este compuesto presenta la desventaja de una pobre absorción en el tracto intestinal, como demuestra el estudio llevado a cabo por Callender, S.T. y Weatherall, D.J., "Iron quelation with oral desferrioxamine", *Lancet*, II, 1980: 689- 691. La fuerte unión del agente quelante al metal bloquea la capacidad del ión para catalizar las reacciones redox.

lo que es allí donde se produce el mayor cúmulo de hierro,²¹³ por supuesto, la síntesis de proteína alcanza un cierto límite a partir del cual no es posible neutralizar los efectos nocivos del hierro en esos tejidos.

Asimismo, se ha comprobado que el exceso de hierro deteriora la función inmune: macrófagos cargados de hierro ven reducida su eficacia frente a un estímulo patológico, como una infección,²¹⁴ habiéndose comprobado en ellos la liberación de especies reactivas de oxígeno, incluido el óxido nítrico (NO*, con una vida media de cerca de 6 segundos), capaz de actuar como vasodilatador, e involucrado en la respuesta inmune.²¹⁵

En el adulto se considera peligrosa una cantidad de hierro elemental de 200 mg/kg, y potencialmente letal una de 300 mg/kg. Ingestas de 20 a 60 mg/kg, producen ya de ligera a moderada toxicidad, requiriendo terapia. En el niño resultan peligrosas y potencialmente letales dosis de 20 a 30 mg/kg.

La dosis letal del hierro se alcanza cuando la cantidad absorbida excede la

²¹³ El trabajo de Pereira, M.C.; Pereira, M.L. y Sousa, J.P., "Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution", *Biomaterials*, 20, ISS 22, 1999: 2193-2198, demuestra, mediante voltametría adsorptiva (corroborada por absorción atómica), cómo el hierro se deposita tanto en hígado como en bazo, tras siete días de administración del metal.

²¹⁴ Esto explica el que, dentro de los distintos síntomas de la intoxicación, pueda aparecer también infección gastro-intestinal, reforzada por la esencialidad del hierro para el crecimiento de bacterias patógenas, como demuestra el trabajo de Coussement, W., en: *Toxicology, Principles and applications*, Niesink, R.J.M.; De Vries, J. y Hollinger, M.A., eds., CRC Inc. and Open University of the Netherlands, Boca Raton, USA, 1996.

²¹⁵ Acworth, I.N. y Baily, B.B., *The Handbook of oxidative metabolism*, ESA Inc., 1995; Crichton, R. y Ward, R., "Iron metabolism in health and disease", *The Biochemist*, Agosto/Septiembre, 1996: 12- 17.

TIBC, es decir cuando la transferrina alcanza su capacidad máxima de unión al metal; normalmente ésta se halla saturada, aproximadamente, al 30% en el plasma. En tales condiciones no une el hierro, que queda así libre en el plasma, resultando entonces tóxica su acción. Niveles plasmáticos superiores a 5 µg/ml son asociados a estados tóxicos graves.

En niños que han superado envenenamientos por ingestión de dosis de hasta 10g de sulfato ferroso, se han encontrado concentraciones iniciales del metal en plasma comprendidas entre 2,76 y 25,5 µg/ml. En casos análogos, tras 3 ó 5 días de una ingesta de 6 a 15 g del mismo compuesto, los niveles plasmáticos medidos el primer y segundo día oscilaban entre 18,8 y 50 µg/ml.²¹⁶

- **Mecanismos de acción**

Uno de los más interesantes mecanismos tóxicos por exceso de metales, es la inducción de liberación de especies reactivas de oxígeno en el metabolismo normal del hierro y del cobre.²¹⁷

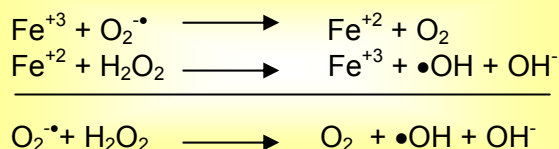
Cuando el Fe^(III) no forma parte de moléculas como la transferrina y ferritina, está disponible para captar electrones de donantes como el ascorbato o el anión superóxido, participando con ello en la generación de radicales hidroxilo

²¹⁶ Baselt, R.C., "Disposition of...", op. cit., 124.

²¹⁷ Hamoutene, D.; Rahimtula, A. y Payne, J., "Iron ore mines leachate potential for oxyradical production", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, ISS 2, 2000: 218-224.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

a partir de H_2O_2 , a través de la reacción de Fenton,²¹⁸ que el hierro cataliza.²¹⁹



Los radicales libres así generados inducen la peroxidación lipídica,²²⁰ que provoca daños en las membranas celulares, mitocondriales y lisosomales, alterando la fluidez de las mismas al originar cambios en sus potenciales, incrementándose con ello su permeabilidad.

El mecanismo merced al cual el hierro ejerce su acción tóxica, sin embargo, no está del todo claro. Uno de los efectos más graves, con posibles consecuencias letales, es el shock secundario ocasionado por el daño local al tubo gastro-intestinal; parece ser que tal daño resulta agravado por la interferencia del hierro con numerosas enzimas del parénquima hepático, cuya actividad en los procesos oxidativos se ve en este caso aumentada: los hepatocitos constituyen el sitio de mayor almacenamiento de hierro, viéndose, en

²¹⁸ Gutteridge, J.M.C. et al, "Superoxide- dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts", *Biochem. J.*, 199, 1981: 263- 265.

²¹⁹ Clothier, B.; Robinson, S.; Akhtar, R.A.; Francis, J.E.; Peters, T.J.; Raja, K. y Smith, A.G., "Genetic variation of basal iron status, ferritin and iron regulatory protein in mice: potential for modulation of oxidative stress", *Biochem. Pharmacol.*, 59, ISS 2, 2000: 115-122.

²²⁰ Hay evidencia de que daños oxidativos juegan un acusado papel en la enfermedad de Alzheimer y la toxicidad de la proteína β -amiloide. (Schubert, D. y Chevion, M., "The role of iron in beta amyloid toxicity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216 (2), Noviembre, 1995: 702-707).

casos de sobrecarga de éste, prácticamente “bombardeados” por las ROS, que ocasionan su muerte,²²¹ siendo entonces reemplazados por fibroblastos; el colágeno que estos producen conduce a la fibrosis hepática y, finalmente, a la cirrosis.

Los daños al corazón se explican asimismo por la acción citotóxica que las ROS ejercen en las células cardíacas:²²² la actividad normal cardíaca requiere el funcionamiento coordinado de todas las células del corazón. Células dañadas o con sus funciones disminuidas, suelen fallar en este aspecto, provocando manifestaciones clínicas que incluyen fallo cardíaco congestivo²²³ –debido al deterioro de los miocitos-, así como arritmias²²⁴ –debidas al daño de las células del sistema conductor cardíaco-.²²⁵ Cualquiera de ellas puede ser mortal. Además el organismo no dispone de vías eficaces de eliminación para el hierro, entrando los productos del metabolismo de nuevo en el ciclo siguiendo la vía anabólica.

Experimentos de laboratorio han demostrado que el hierro a niveles tóxicos altera el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, probablemente por

²²¹ Bonkovsky, H.L., “Iron and the liver”, *Am. J. Med. Sci.*, 301, 1991: 32- 43.

²²² Buja, L.M. y Roberts, W.C., “Iron and the Heart”, *Am. J. Med.*, 51, 1971: 209- 221.

²²³ Fields, M. y Lewis, C.G., “The interaction between dietary copper and excess in iron increases risk of heart disease” USDA, Beltsville Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD 20705 USA; en: *Abstracts of 10th Intern. Symposium on trace Elem. in Man and Animal*, TEMA 10, Mayo, 1999: 7.

²²⁴ Kuryshev, Y.A.; Brittenham, G.M.; Fujioka, H.; Kannan, P.; Shieh, C.C.; Cohen, S.A. y Brown, A.M., “Decreased sodium and increased transient outward potassium currents in iron-loaded cardiac myocytes. Implications for the arrhythmogenesis of human siderotic heart disease”, *Circulation*, 100, ISS 6, 1999: 675-683.

²²⁵ Schellhammer, P.F. et al., “Histochemical studies of the myocardium and conduction system in acquired iron- storage disease”, *Circulation*, 35, 1967: 631- 637; Liu, P. y Olivieri, N., “Iron overload cardiomyopathies: new insights into an old disease”, *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, 8, 1994: 101- 110.

desplazamiento de oligometales de algunas enzimas,²²⁶ con el consiguiente aumento de su actividad metabólica en el ciclo de los ácidos cítrico y láctico.

Por otra parte, el daño hepático conlleva liberación de ferritina, a la que se atribuye un efecto vasodilatador, hipoprotrombinemia e hipoglucemia. Asimismo se puede presentar necrosis con hemorragias intestinales²²⁷ por lesiones vasculares incluso a nivel portal, que pueden ser causa de infartos intestinales.

II.6.3.d.- Ferromagnetismo y paramagnetismo

El ferromagnetismo es una propiedad que presentan ciertos metales, aleaciones, elementos de transición del grupo del hierro, tierras raras y elementos actínidos, en los que por debajo de la temperatura de Curie, los momentos magnéticos atómicos tienden a alinearse en una dirección común.

Este fenómeno se caracteriza por la fuerte atracción que un cuerpo imanado ejerce sobre otro, así como por los elevados valores que, en las sustancias ferromagnéticas, alcanza la permeabilidad magnética, con frecuencia varios miles de veces superior a la de las sustancias diamagnéticas. Además, en las sustancias ferromagnéticas, la permeabilidad no es una constante

²²⁶ Moeschlin, S., "Thallium poisoning", *Clin. Toxicol.*, 17(1), Agosto, 1980: 133-146.

²²⁷ Proudfoot, A., *Diagnosis and management of acute poisoning*, Blackwell, Oxford, 1982; Las lesiones con hemorragias, especialmente cuando se han ingerido preparados de lenta cesión y en forma de píldoras, pueden degenerar en una necrosis parcelar que facilita el paso del hierro en círculo (Casarett, L.J., *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisoning*, 2º ed., Macmillan, New York, USA, Doull, J.; Klaassen, C.D. y Amdur, M.O., eds., 1982).

característica, sino que depende de la intensidad del campo excitante, de la temperatura y de la historia magnética del material. El ferromagnetismo es una propiedad que depende de la estructura cristalina propia de los sólidos, no existiendo ningún átomo que sea ferromagnético aisladamente; así, una sustancia ferromagnética sólo presenta esta propiedad si se halla en estado sólido: el hierro no es ferromagnético si se halla en estado de vapor, y las soluciones que contienen iones del hierro, tampoco son ferromagnéticas.

Las sustancias caracterizadas por poseer una susceptibilidad magnética positiva²²⁸ y una permeabilidad magnética mayor que la del vacío, son las llamadas sustancias paramagnéticas. La teoría clásica del paramagnetismo, formulada por Langevin hacia 1905, se funda en la presencia, en la sustancia, de dipolos magnéticos a nivel de átomo o molécula. En ausencia de un campo exterior estos dipolos, debido a la agitación térmica, están completamente desordenados, por lo que su acción se compensa y no puede observarse imantación a nivel macroscópico; por el contrario, en presencia de un campo magnético, tales dipolos tienden a orientarse en el sentido del campo, con lo que sus efectos se suman, resultando una imantación del cuerpo. El paramagnetismo requiere, por tanto, la existencia de dipolos magnéticos permanentes, y según su origen se distinguen el *paramagnetismo electrónico* y el *nuclear*. el primero se manifiesta en las sustancias cuyos átomos o moléculas poseen un momento

²²⁸ Como ya se indicó anteriormente, bajo la acción de un campo magnético intenso, las sustancias paramagnéticas tienden a dirigirse hacia la región de intensidad máxima del campo.

magnético, distinto de cero,²²⁹ mientras que el segundo es propio de aquellas sustancias cuyo momento magnético no nulo es debido al núcleo.

El paramagnetismo nuclear produce efectos del orden de 10^6 veces menores que el orbital, por lo que sus efectos quedan enmascarados por los efectos magnéticos de los electrones (ya sean de carácter diamagnético o paramagnético) y únicamente son observables en experimentos de resonancia nuclear.

El paramagnetismo electrónico puede tener su origen en diversas causas, y las sustancias que presentan magnetismo electrónico pueden clasificarse en los siguientes grupos:

- a) Átomos y moléculas que poseen un número impar de electrones, como los radicales libres y el óxido nítrico gaseoso.
- b) Los átomos e iones con niveles electrónicos internos incompletos, como los elementos de transición, las tierras raras y diversas sales; en este grupo están incluidas diversas sustancias ferromagnéticas.

²²⁹ En las sustancias paramagnéticas que poseen electrones desapareados, cada uno de ellos tiene un espín intrínseco o momento angular y, asociado a él, un momento magnético. En ausencia de campo magnético externo, todos los electrones tienen la misma energía, independiente de la dirección a la que apuntan. Si se aplica un campo magnético externo, los momentos magnéticos de los electrones se alinean en relación con este campo externo, produciéndose dos orientaciones posibles, correspondientes a los números cuantitativos de espín $+1/2$ y $-1/2$. El campo magnético actúa, pues, separando los electrones en dos grupos con diferentes energías: los alineados en paralelo y en antiparalelo. Las transiciones entre estos dos niveles energéticos se corresponden con absorciones o emisiones de radiación electromagnética a una frecuencia determinada.

ENCUADRAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

- c) Algunas mezclas que comprenden oxígeno molecular y radicales orgánicos dobles.
- d) Los metales en los que el paramagnetismo se debe al momento magnético asociado al espín de los electrones de conducción.

La mayoría de los materiales biológicos son diamagnéticos, pero existe un número significativo que presenta propiedades paramagnéticas. La presencia de componentes ferromagnéticos y antiferromagnéticos se ha detectado sólo en algunos casos particulares, como en las magnetobacterias. Entre los elementos biológicos paramagnéticos cabe destacar dos grupos:

- a) Complejos moleculares con metales de transición (Fe, Cu, Mn, Co).
- b) Los radicales libres.

Dentro del primer grupo se encuentra una gran variedad de macromoléculas implicadas en procesos biológicos importantes, como la hemoglobina, mioglobina y citocromos; en todas ellas el hierro es parte estructural y funcional importante. Por tanto, no resulta descabellado plantearse las interacciones y posibles efectos biológicos que un campo electromagnético externo pueda tener en la funcionalidad de estas moléculas.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

La descripción de los experimentos realizados en nuestro estudio ha de llevar, en primer término, a detallar el material utilizado para su ejecución. Con el fin de proceder con el mayor orden posible, vamos a proporcionar, de entrada, la descripción estructural y funcional de cada una de las cámaras generadoras de campos magnéticos de que nos hemos servido en los diferentes ensayos, para exponer, a continuación, el resto del material fungible utilizado en ellos.

III.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS CÁMARAS GENERADORAS DE CAMPOS MAGNÉTICOS UTILIZADAS EN LA PARTE EXPERIMENTAL

Las cámaras utilizadas han sido tres: dos generadoras de campos magnéticos de baja frecuencia (una preparada para los estudios *in vitro* y otra, de mayor capacidad espacial, para los estudios *in vivo*) y una generadora de campos de radiofrecuencia. Pasaremos a continuación a la descripción de cada una, así como a los métodos de calibración y puesta a punto de las mismas.

III.1.1- Cámara de generación de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50Hz) e intensidad variable, empleada en los estudios *in vitro*

III.1.1.a.- Diseño y caracterización

Para la realización de los experimentos con cultivos celulares de linfocitos humanos, se ha utilizado una cámara en la que el campo magnético a estudio es generado en el interior de un arrollamiento cilíndrico de hilo de cobre, de radio 7,5 cm y 58 cm de longitud, diseñada y caracterizada por el Departamento de Física Aplicada III de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Con objeto de uniformizar dicho campo en el interior de la cámara, el número de espiras en los extremos del cilindro ha sido incrementado, resultando así la longitud total del hilo de cobre empleado de 1.814 m, con una resistencia total de 31 Ω .

La figura 7 representa, esquemáticamente, el sistema experimental resultante para la generación de los campos magnéticos objeto del estudio, de intensidad variable y frecuencia de 50 Hz. La corriente en el arrollamiento se limitó a 1 A, valor máximo de corriente admisible por el auto-transformador, y que se corresponde con una intensidad de campo magnético de 64 G (6,4 mT, 130 veces la intensidad del campo terrestre). En las figuras 8, 9 y 10 se muestra el aspecto real de la cámara y sus

componentes, así como su imagen una vez situada dentro de la estufa de incubación.

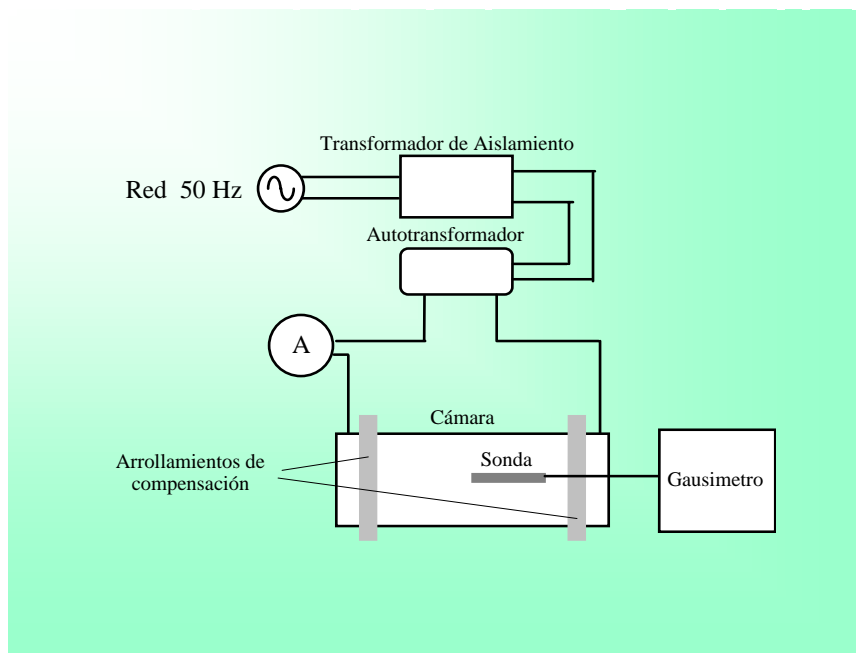


Fig. 7.- Dispositivo experimental para la generación de campos magnéticos de 50 Hz e intensidad variable.

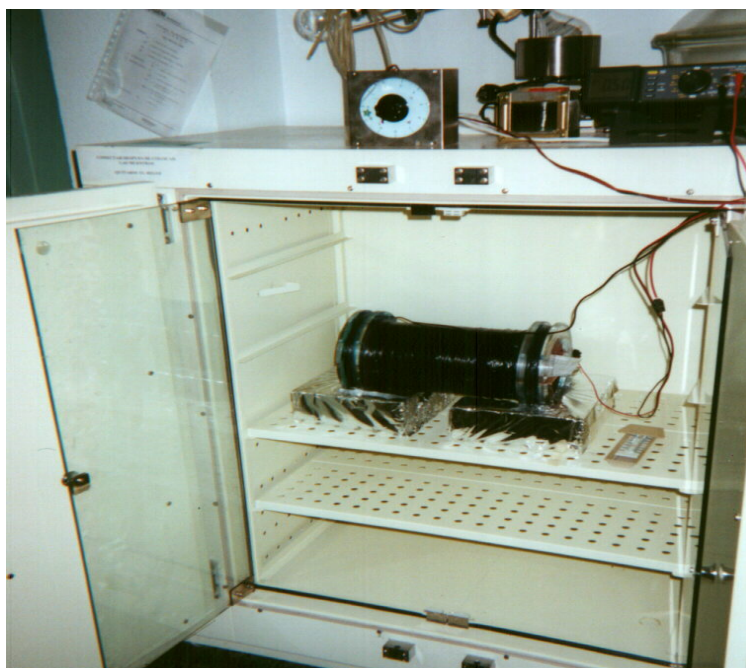


Fig. 8.- Vista de la cámara generadora de campo magnético de 50 Hz utilizada en los experimentos *in vitro* una vez dentro de la estufa de incubación.

MATERIAL Y MÉTODOS

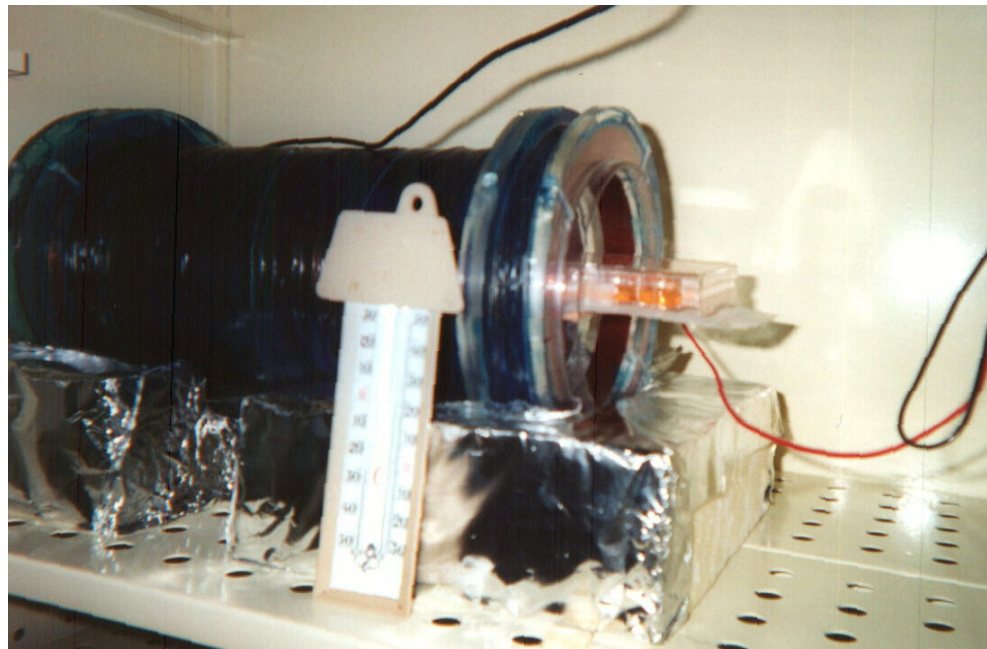


Fig. 9.- Detalle de la cámara generadora de campo magnético de 50 Hz utilizada en los experimentos *in vitro* dentro de la estufa de incubación.

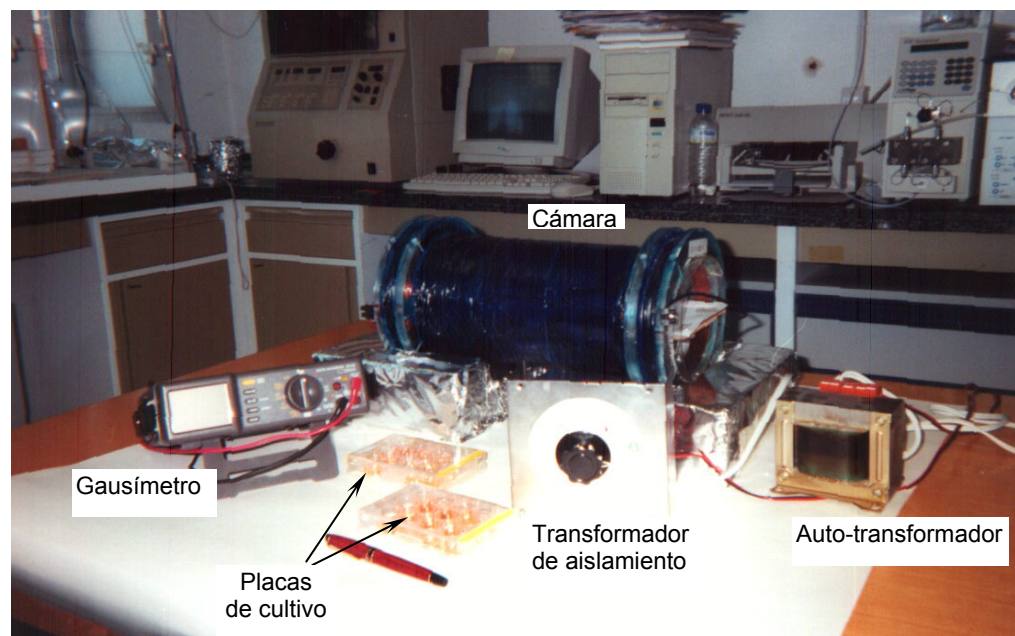


Fig. 10.- Componentes del dispositivo generador de campos magnéticos de 50 Hz e intensidad variable.

III.1.1.b- *Calibración de la cámara*

La calibración de la cámara se realiza en puntos situados en el interior de la misma a lo largo de distintos ejes longitudinales y separados entre sí 2 cm.

Los ejes medidos son cinco:

- a) El eje central.
- b) Dos ejes situados a ambos lados del eje central a una distancia de 2 cm.
- c) Dos ejes situados a ambos lados del eje central a una distancia de 4 cm.

La grátícula obtenida para la distribución de intensidad del campo magnético en el interior del solenoide permite la posterior colocación precisa de las muestras y asegura la repetitividad de las medidas.

La figura 11 muestra la variación del campo magnético B en Gauss (G) con la distancia a lo largo de los ejes seleccionados, para una corriente de 0,5 A correspondiendo a una intensidad de campo de 32 G (3,2 mT). Se observa una buena uniformidad del campo en el rango de los 8-32 cm en la dirección longitudinal, lo que proporciona un espacio útil de 24 x 10 cm para la colocación de muestras, con una variación en la intensidad de campo inferior al 1,5% en toda la región.

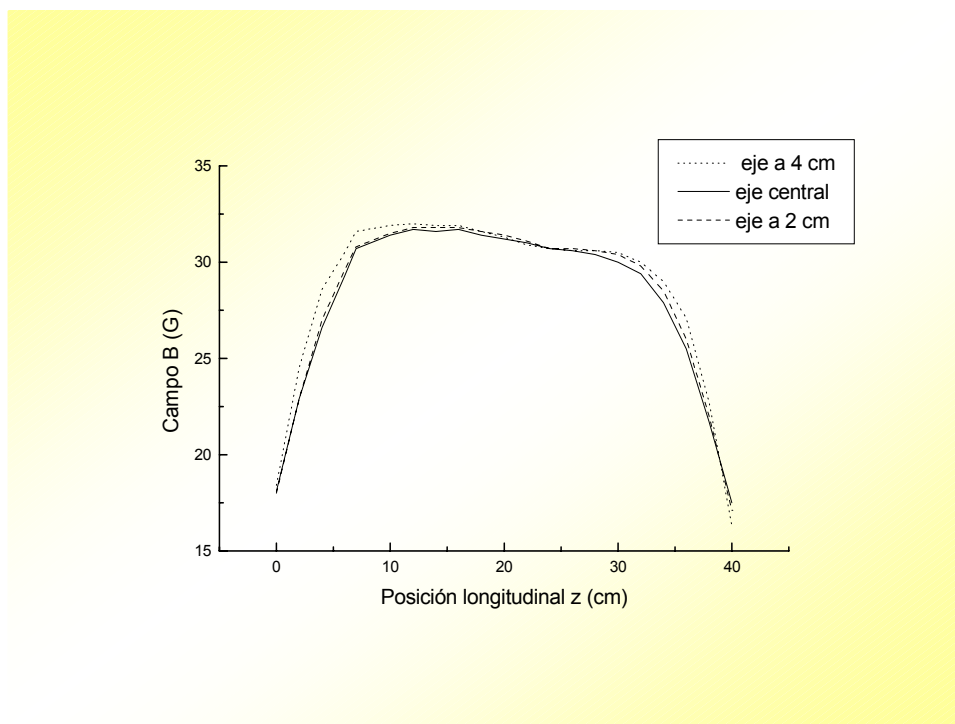


Figura 11.- Distribución de campo magnético en el interior de la cámara

III.1.2.- Cámara de generación de campos magnéticos de 27,5 Oersted, con frecuencia de 50Hz, utilizada en los estudios *in vivo*

Esta segunda cámara generadora de campos magnéticos de baja frecuencia nos fue proporcionada por el Instituto de Ciencias de Materiales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid. Es, sustancialmente, igual a la anterior, con la particularidad de que la disposición de su solenoide permite la colocación, en su interior, de las jaulas utilizadas para el

mantenimiento de los ratones, sujeto del estudio de los posibles efectos de estos campos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

La jaula con los animales se coloca geométricamente en el interior del cilindro que confina el campo electromagnético del solenoide, convenientemente evaluado mediante dos gráficas: de potencia de campo magnético (como viene reflejado en la gráfica de la figura 12) y de frecuencia (que se muestra en la figura 13), gráficas éstas que se obtienen a partir de la calibración de la cámara de manera análoga a la explicada anteriormente para la cámara utilizada en los estudios *in vitro*.

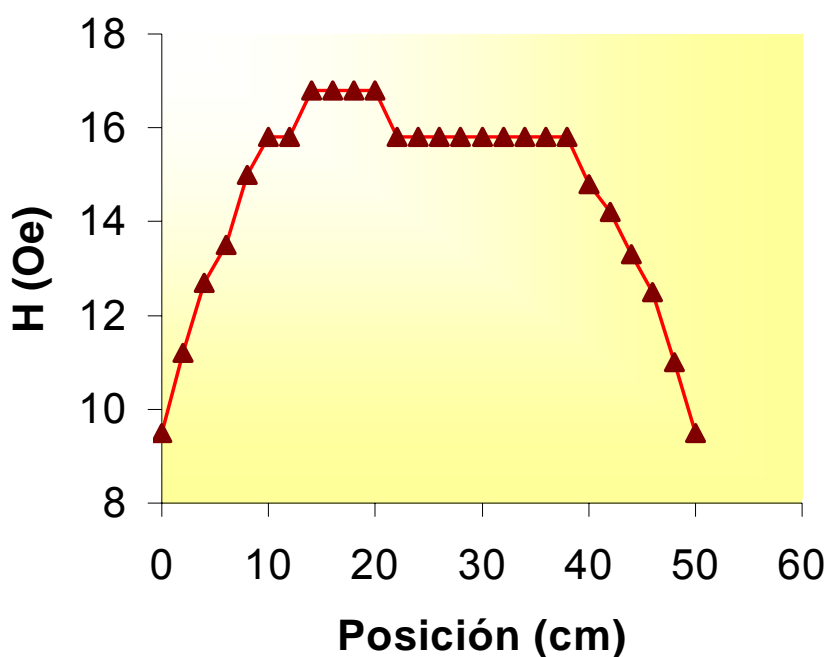


Fig.12.- Gráfica de calibración de la cámara de campos magnéticos.

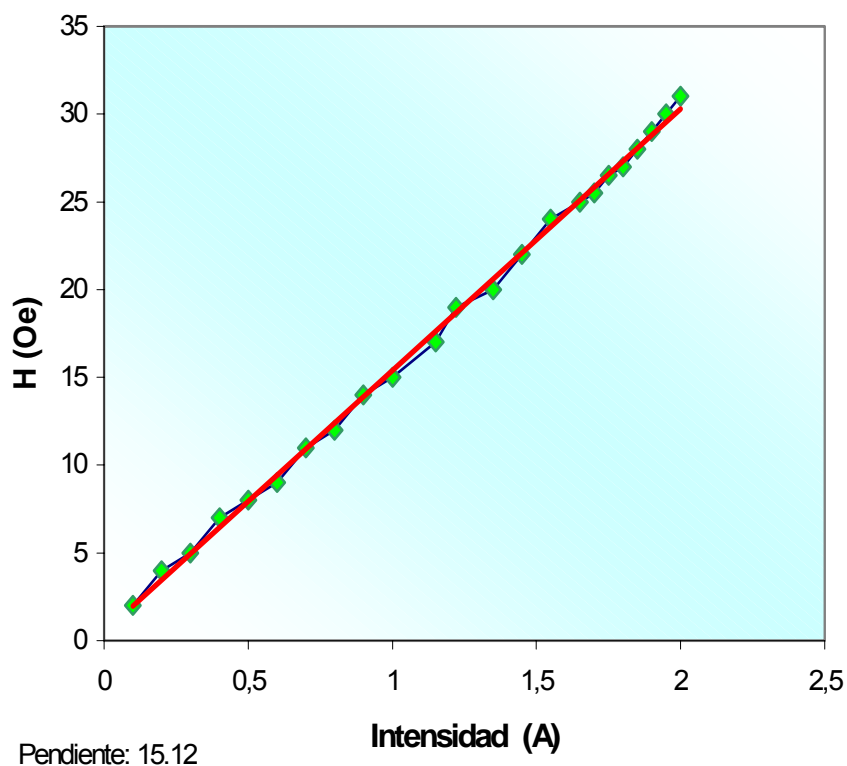


Fig. 13.- Gráfica de calibración de intensidad de corriente.

De esta manera, queda establecido el hecho de que el campo electromagnético se halla confinado en el interior de la estructura geométrica del solenoide, consistente en dos arrollamientos en espiral en forma de anillo de 43 cm de diámetro cada uno, sujetos sobre un soporte de madera de 39 x 52 cm y colocados en paralelo uno frente a otro; La cámara se halla conectada a un

MATERIAL Y MÉTODOS

gausímetro, que permite la variación manual de la intensidad del campo, como se puede comprobar en la imagen de la figura 14.

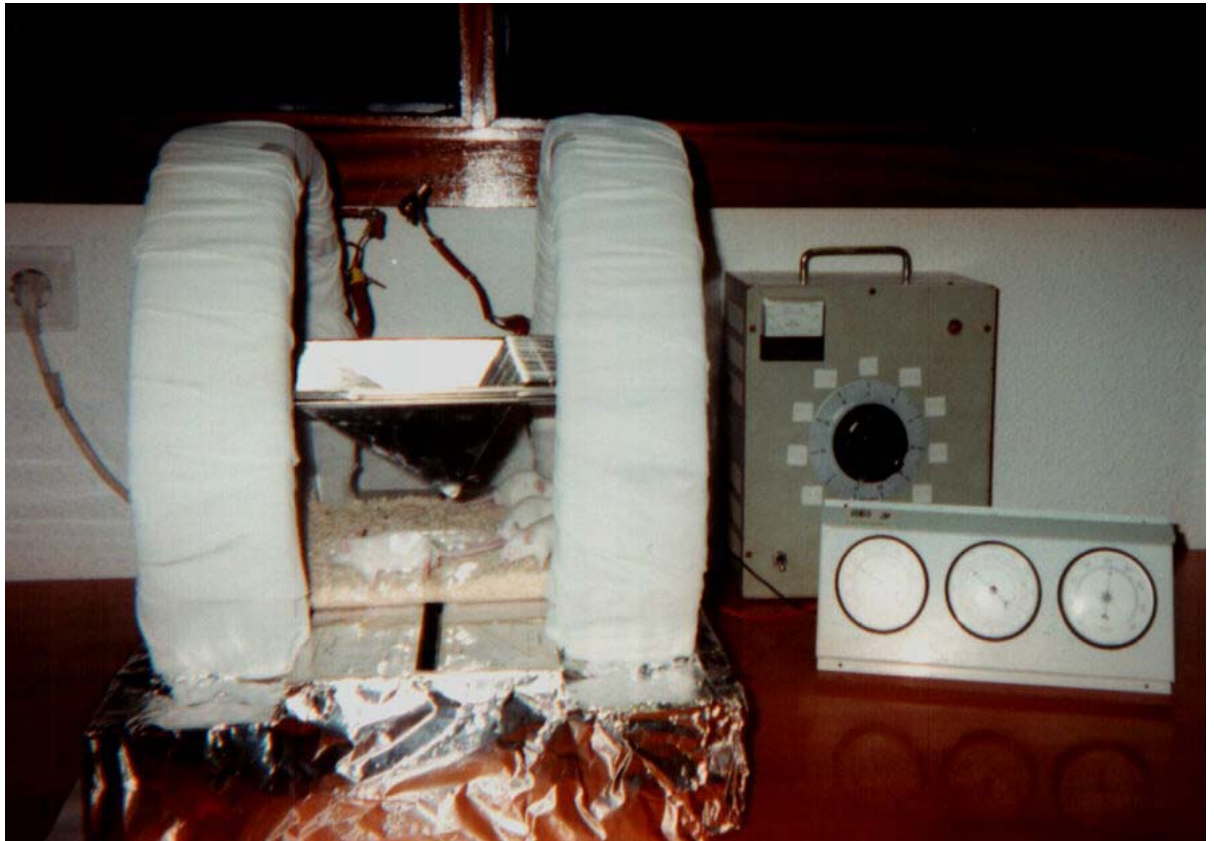


Fig. 14.- Vista de la cámara generadora de campos magnéticos de 50 Hz utilizada para los experimentos *in vivo*.

La intensidad máxima del campo electromagnético generado por el solenoide descrito es de 27,5 Oersted (lo que se corresponde con 27,5 G; 275 voltios y 2,75 mT), siendo la frecuencia de este campo de 50 Hz, al igual que el de la cámara utilizada en los experimentos *in vitro*.

III.1.3- Descripción de la cámara generadora de campos electromagnéticos de radiofrecuencia

Con el sistema experimental de generación de campos de radiofrecuencia se han estudiado los cambios en las propiedades eléctricas (conductividad y permitividad) de diferentes tejidos de rata tratadas con los metales a estudio.

La determinación experimental de dichas propiedades eléctricas se realiza midiendo los coeficientes complejos de reflexión y transmisión de una muestra de tejido biológico utilizando un analizador de red (VNA). Los experimentos se llevaron a cabo irradiando las muestras a la frecuencia de 2,45 GHz.

III.1.3.a.- Diseño de la célula de medida

1) Contenedor de muestra: a fin de conseguir una irradiación uniforme y controlada de las muestras a la frecuencia anteriormente mencionada de 2,45 GHz, fue necesario el diseño, por parte del equipo del Departamento de Física Aplicada III de la Facultad de Ciencias Físicas, UCM, de un contenedor de muestra, consistente en un bloque de metacrilato con una cavidad rectangular en su centro de 44mm de largo, 11mm de alto y 2 mm de grosor.²³⁰ La muestra biológica se coloca en esta cavidad rectangular. El citado bloque se encuentra dividido en dos piezas a fin de facilitar la colocación de los cortes de tejido biológico en que consiste la muestra (como

²³⁰ Sebastián, J.L. et al., 20th BEMS Meeting, Junio, 1998: 172-173.

se refleja en la figura 15).

La permitividad compleja del bloque fue medida experimentalmente, resultando ser sus valores de $\epsilon_r = 2,6$ y $\sigma = 4,96 \times 10^{-4}$ S/m. El bloque de metacrilato rellena completamente una sección de la guía de ondas WR430, útil para trabajar en el rango de 1,7 a 2,6 GHz.

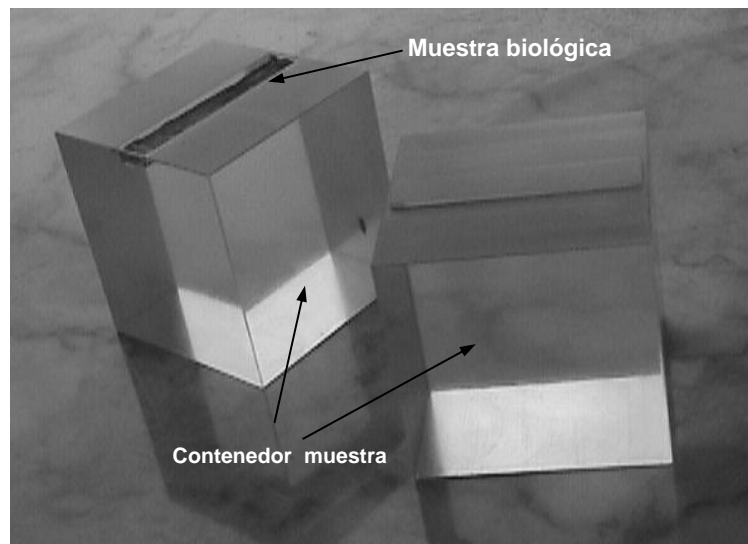


Fig. 15- Bloque contenedor de muestra de metacrilato.

2) Una sección de guía de ondas WR 430 de aluminio altamente pulido de 34 cm de longitud, que puede ser modificada mediante un cortocircuito variable con objeto de fijar los planos de referencia apropiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la frecuencia de trabajo elegida, el tamaño de la muestra (11 mm) es lo suficientemente pequeño, comparado con la longitud de onda de la guía (148 mm), como para asumir que un potencial uniforme es aplicado a la totalidad de la muestra colocada en el centro de dicha guía de ondas.

Las figuras 16 y 17 representan una sección de la guía de ondas con el contenedor de muestra ya dispuesto en su interior, de la manera en que se coloca una vez todo listo para realizar las mediciones.

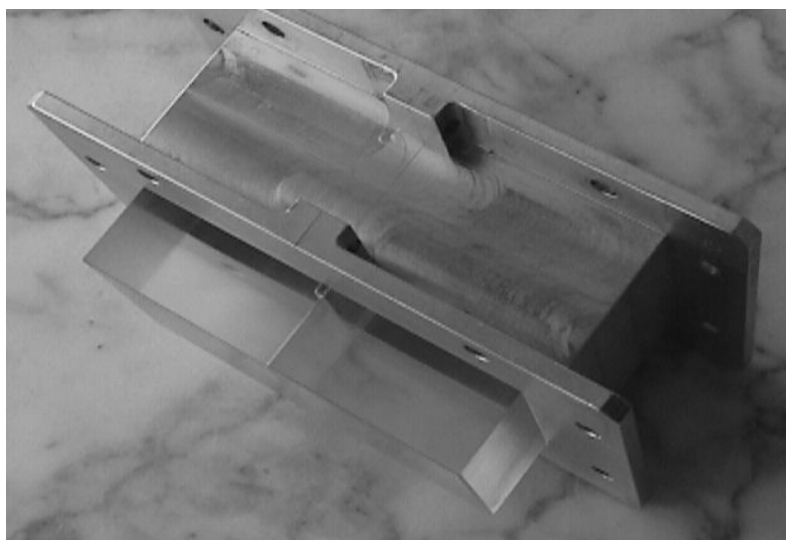


Fig. 16.- Sección de la guía de ondas con el contenedor de muestra en su interior

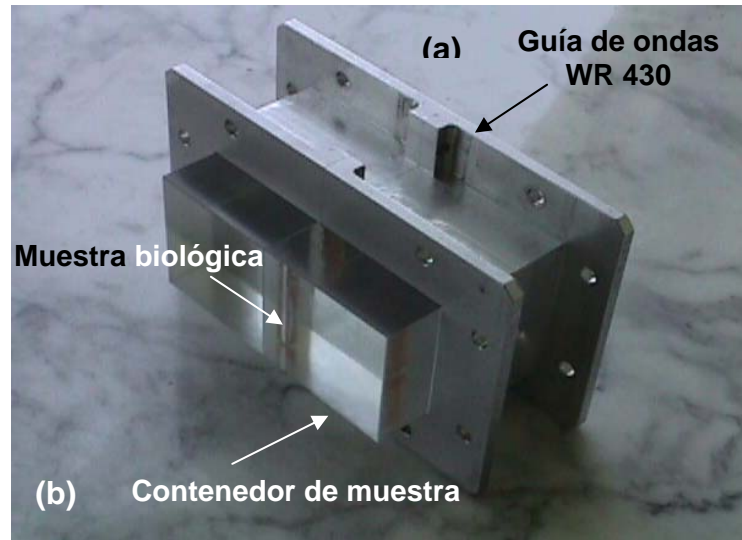


Fig. 17.- Sección de la guía de ondas (a) con el contenedor de muestra en su interior (b).

El sistema experimental para la radiación y caracterización de muestras consta, asimismo, de un analizador vectorial Hewlett-Packard 8720 y dos transiciones guía/coax de muy baja razón de onda estacionaria. Las mencionadas transiciones se colocan en los extremos de la sección de guía de ondas. A fin de conectar cada una de las transiciones al analizador de red, son utilizados cables coaxiales semirígidos.

La calibración del sistema de medida se realizó utilizando la sección de la guía de onda WR430, tres longitudes estándar (corta, abierta y banda ancha)

y la corrección de errores integrada en el procesador interno del VNA. Esta calibración permitió extraer con exactitud los coeficientes de transmisión y reflexión del bloque de metacrilato. Para realizar la calibración del sistema de medida, la muestra de tejido biológico se reemplaza por una pieza de metacrilato de las mismas dimensiones.

III.1.3.b.- *Determinación de la permitividad dieléctrica compleja*

Se utiliza el simulador HP-HFSS (HP High Frequency Structure Simulator 5.0, HP Easof Design Technology, Hewlett Packard) para realizar un análisis en 3-D de la distribución de los campos electromagnéticos dentro de la sección de guía de ondas WR430 conteniendo muestra de tejido biológico.²³¹

Dicho simulador permite la determinación del valor de la permitividad dieléctrica compleja de un tejido que produciría los mismos valores de los coeficientes complejos de reflexión y de transmisión que han sido establecidos experimentalmente.

Así, para cada tejido biológico simulado se obtienen analíticamente cuatro parámetros: dos módulos y dos fases. Los valores correctos son aquellos que se corresponden con los experimentales en los mismos planos de referencia.

²³¹ HP High-Frequency Structure Stimulator 5.0 HP Eesof Design Technology. Hewlett Packard.

III.2.- COMPUESTOS METÁLICOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS

IN VITRO E IN VIVO

Una vez establecidas las bases de esta parte experimental con la descripción de las cámaras generadoras de los campos magnéticos a estudio, pasaremos, como ya adelantábamos con anterioridad, a enumerar los distintos compuestos químicos elegidos para estudiar la existencia de un hipotético sinergismo entre sus efectos y los de los campos magnéticos, como algunos autores vienen postulando.

En primer lugar se ha utilizado, tanto en los experimentos *in vitro* como en los estudios *in vivo*, para el análisis de los efectos del plomo, el compuesto Plomo (II) nitrato, de la casa Merk, que presenta las características reflejadas en la tabla 7.

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $\text{N}_2\text{O}_6\text{Pb}$	
Tóxico para la reproducción, nocivo	Soluble en agua (20°C): 525 g/L
M = 331,21 g/mol	pH (50 g/L, H ₂ O, 20°C): 3-4
Densidad aparente ~ 1.850 kg/m ³	Densidad específica (20°C): 4,53 g/cm ³

Tabla 7.- Características del compuesto de plomo empleado en la parte experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

En cuanto al compuesto de hierro empleado, se ha tratado de Hierro (II) sulfato hidrato, conocido por el nombre común de *vitriolo verde*, y asimismo de la casa Merk, cuya caracterización se presenta en la tabla 8.

$\text{Fe SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ $\text{FeO}_4\text{S}_x \text{H}_2\text{O}$	
Nocivo, irritante	Soluble en agua (20°C) ~ 270 g/L
M = 151,91 g/mol	pH (50 g/L, H ₂ O, 20°C): 2,5 -3,5
Densidad aparente ~ 850 kg/m ³	DL ₅₀ oral rata : 319 mg/kg

Tabla 8.- Características del compuesto de hierro empleado en la parte experimental.

A la hora de preparar estos productos para su pertinente administración en los distintos experimentos, se realizaron disoluciones de cada compuesto a la concentración final de 10^{-2}M . Todas las disoluciones se esterilizaron por filtración, con filtros de 0,22 μm , (Millipore), y se diluyeron con agua bidestilada estéril; posteriormente, y a partir de esta disolución “madre”, se procedió a realizar las diluciones convenientes para cada caso, como se expondrá en detalle más adelante.

III.3.- EXPERIMENTOS *IN VITRO*

III.3.1.- Estudio del efecto de campos magnéticos en sistemas celulares y su posible sinergismo con plomo y hierro

Pasaremos, en este apartado, a describir el desarrollo de los estudios *in vitro* llevados a cabo a fin de establecer si existe o no efecto en la exposición de cultivos celulares a la acción de campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) e intensidades variables (han sido utilizadas para nuestro trabajo las de 3,2, 6,4 y 9,6 mT, realizándose 20 experimentos por cada intensidad de campo), así como a probar la hipótesis de un posible sinergismo de estos campos con el efecto tóxico de los metales elegidos para el estudio.

Con este objeto se han empleado, como ya se comentó en el plan de trabajo, linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, la cámara generadora de campos magnéticos descrita en el epígrafe III.1.1 del presente capítulo y los compuestos metálicos relacionados en el apartado III.2 del mismo.

Los bioindicadores a utilizar para evaluar los efectos del campo aplicado serán el estudio de la proliferación celular y la aparición de micronúcleos, como exponentes de daño genético.

El experimento se desarrolla, en cuanto al resto de material y los métodos, como a continuación se expone.

III.3.1.a.- *Linfocitos: obtención y cultivo*

A fin de asegurar una razonable homogeneidad en los resultados, y a modo de control de calidad, la sangre periférica humana utilizada procede siempre de un mismo donante voluntario, no fumador, sin enfermedad conocida y, por ello, considerado supuestamente sano. Se utiliza sangre de reciente extracción, ya que se ha comprobado, en experimentos previos, que en caso contrario se produce una importante pérdida de linfocitos en el proceso de su aislamiento.

Los linfocitos son, así, aislados de 20 mL de sangre extraída en ayunas de la vena cubital del brazo y distribuida en dos tubos de 10 mL con heparina-litio (Eurotubo). En cabina de flujo laminar se procede a la dilución del contenido de ambos tubos con un volumen igual (10 mL) de disolución salina-fosfatos (PBS), tamponada a pH fisiológico 7,4. Una vez homogeneizado el contenido por agitación suave en tubos estériles de 50 mL, se añade a cada uno un volumen de 10 mL de FICOL (*lymphocytes isolation solution*, Rafer, S.L., España), centrifugándose ambos a 1.900 rpm durante 20 minutos, a fin de producir la sedimentación de hematíes, plaquetas y demás fracción precipitable y la separación del suero.

Como resultado de esta primera centrifugación, se obtiene una banda grisácea central que separa dos fases claramente diferenciables por su coloración: la superior que corresponde al suero (amarillenta) y la inferior o

MATERIAL Y MÉTODOS

fracción precipitable (rojiza). Pues bien, en esa banda central de color grisáceo, es donde se ubican los linfocitos, que deben ahora ser recogidos con pipeta estéril y colocados en un nuevo tubo, asimismo estéril, al que se añaden 20 mL de PBS para su lavado, por dos veces, mediante centrifugación a 1.900 rpm durante 5 minutos en centrífuga refrigerada a 0-4°C.

Por último se llevan los linfocitos a un volumen final de 5mL con medio de cultivo completo RPMI 1640, enriquecido con un 10% de suero fetal, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, y un 5% de glutamina, para proceder a continuación a su recuento. Se obtienen, por regla general, unos 10 millones de linfocitos aproximadamente, que se diluyen con el medio descrito para su distribución en dos placas de 12 pocillos, de manera que cada pocillo contenga aproximadamente un millón de células; de estas dos placas, una constituirá el control negativo, incubándose a 37°C en ausencia de campo magnético y otra será la tratada, exponiéndose a la acción del campo magnético, asimismo a 37°C.

Para el estudio de la posible acción sinérgica de los campos magnéticos y los metales, se incuban las células en presencia de diferentes concentraciones de éstos. Ya se describieron en el apartado anterior los compuestos utilizados de plomo y hierro, así como la preparación de la disolución 10^{-2} M de cada uno de ellos. A partir de esta disolución “madre”, en diluciones de 1/10, se añade a cada pocillo de las dos placas la cantidad necesaria para que las concentraciones finales sean de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} M de cada metal por pocillo, dejándose tres,

que denominaremos “controles”, sin metal, y uno más, que llamaremos “blanco”, lleno únicamente con el medio de cultivo, sin linfocitos ni metales, completándose así los doce pocillos de cada placa.

Con el objeto de conseguir un crecimiento celular suficiente, empleamos fitohemaglutinina-M (PHA-M), purificada mediante técnicas cromatográficas estándar a partir de *Phaseolus vulgaris*, (judía roja); esta sustancia, que contiene una familia de cinco isoelectinas, es utilizada como mitógeno en el cultivo de linfocitos²³² al presentar potente actividad mitogénica y aglutinante de células.²³³ La PHA-M es la forma mucoproteica de dichas isoelectinas.²³⁴

Se añade, por tanto, la PHA liofilizada (Boheringer Mannheim Biochemica) a cada pocillo, a la concentración final de 10 µg/mL, para la inducción de la división celular, y se incuban las placas según se indicó anteriormente, en presencia y ausencia de campo magnético, a 37°C.

Ya que posteriormente se va a determinar el posible daño genético de la irradiación mediante la técnica de los micronúcleos con bloqueo citogenético, como más adelante se detallará, es necesario, tras 72 horas de incubación,

²³² Dillner-Centerlind, M.L.; Hellstrom, U.; Robertsson, E.S.; Hammerstrom, S. y Perlmann, P., “Mitogenic responsiveness of human T-lymphocyte subpopulations: regulation by suppressive Fc-receptor-bearing T cells and influence of fractionation procedures”, *Scand. J. Immunol.*, 12(1), 1980: 13-21; Dillner-Centerlind, M.L. et al., *J. Immunol.*, 10, 1980: 434-442.

²³³ Hammerström, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 1982: 1611-1615; Unsgaard, G.; Hammerstrom, J. y Lamvik, J., “Dissociation between tumour cell cytostatic and immunosuppressive capacity of human monocytes activated with lymphokines”, *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.*, 90(2), Abril, 1982: 73-79.

²³⁴ Leavitt, R.D. et al., *J. Biol. Chem.*, 252, 1977: 2961-2966.

MATERIAL Y MÉTODOS

añadir citocalasina-B, ($C_{29}H_{37}NO_5$),²³⁵ toxina fúngica (aislada de *Helminthosporium dematioideum*) a la que las células son permeables y que impide la citoquinesis al bloquear la formación de los microfilamentos contráctiles que constituyen los microtúbulos del huso acromático, dando así lugar al denominada bloqueo citogenético (BC) tras la primera división celular; el mencionado BC provoca, a su vez, la presencia de células binucleadas en las que, caso de haber daño genético, se apreciarán los micronúcleos indicadores del mismo.

La preparación de la citocalasina (Sigma-Aldrich) se realiza disolviendo 10 mg de ésta en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se diluye esta solución a razón de 1:9 mL con el medio de cultivo. Se añade por último a cada pocillo, de manera que su concentración final resulte de 3 µg/mL, y se vuelven a colocar las placas en la estufa de incubación hasta completar una exposición de 96 horas, tiempo que, como a continuación se detalla, resultó ser el más idóneo para la consecución de nuestros objetivos.

- **Determinación del tiempo de incubación en la cámara de campo magnético.**

A fin de establecer el tiempo necesario de incubación a 37 °C para conseguir un crecimiento apropiado de los linfocitos, se ha utilizado el

²³⁵ Siguiendo la técnica del BC descrita por Fenech, M., "The cytokinesis- block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.*, 285, 1993: 35-44.

MATERIAL Y MÉTODOS

método de la timidina tritiada que, a través de su incorporación directa al ADN, es considerado marcaje radiactivo de la multiplicación del material genético y de la división celular.²³⁶ Asimismo se establece la concentración óptima a emplear de fitohemaglutinina (PHA), ya que el fabricante indica un rango amplio de utilización.

Se extraen los linfocitos según la técnica ya explicada, obteniéndose una suspensión de 1 millón de células/100 μ L. Esta solución es vertida en cada uno de los pocillos de las placas de cultivo en dos series de seis pocillos, de manera que resulta una concentración de 1×10^6 células/pocillo.

Se realiza la dilución a la mitad para la segunda placa de doce pocillos, con una concentración final de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo. Ambas series se completan con medio de cultivo para un volumen final de 1 mL/pocillo.

La fitohemaglutinina (PHA) se prepara en proporción de 10 mg PHA/10 mL, diluyéndose posteriormente a 1/10. De esta disolución final se vierten en los pocillos las concentraciones de 50 μ L/pocillo (siendo la concentración resultante, por tanto, de 1/100); 10 μ L/pocillo (concentración de 1/500); y 5 μ L/pocillo (concentración de 1/1000).

²³⁶ Han, C.; Wu, G.; Yin, Y. Y Shen, M., "Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity on cadmium chloride in various genotoxicity assays", *Food Chem. Toxicol.*, 30, 1992: 521-524.

Las distintas diluciones de PHA se prueban por triplicado, excepto en los tres pocillos control que carecen de ella.

Se disponen pues, de esta manera, cuatro placas de 12 pocillos, con los experimentos de cada dilución de PHA por triplicado y tres controles negativos. Cada una de las placas se mantiene en estufa a 37°C hasta cumplirse las 24, 48, 72, y 96 horas de incubación respectivamente. 15 horas antes de ser sacadas de la estufa, se adiciona la timidina tritiada a cada una de las placas, a fin de detectar el crecimiento y división por duplicación del DNA celular

Posteriormente se van colocando en congelador hasta que finaliza la incubación total de las cuatro placas, y se sigue la metodología indicada para el conteo de radiactividad como sigue: una vez descongeladas las placas, se someten a sistema de filtración y lavado a vacío a través de filtros, es decir, cada uno de los filtros retiene las células, que son lavadas para eliminar la radiactividad externa sobrante. Tras este tratamiento, se introducen los filtros en tubos colocados en los viales apropiados y, finalmente, se añaden 2 mL de líquido de centelleo (Aquasol).

Se procede a continuación, con las muestras así tratadas, a conteo durante 1 minuto en Contador Beta para ^3H . Finalizado el conteo de la timidina tritiada se construyen las gráficas, representándose en ordenadas

MATERIAL Y MÉTODOS

las cuentas por minuto de ^3H -tim, y en abcisas la dilución de fitohemaglutinina, en grupos según el tiempo de incubación en horas.

En las figuras siguientes se observan las diferencias, en cuentas por minuto (cpm) de timidina tritiada, en los cultivos de linfocitos de 500.000 células por pocillo (figura 18) y en los cultivos de 1.000.000 de células por pocillo (figura 19).

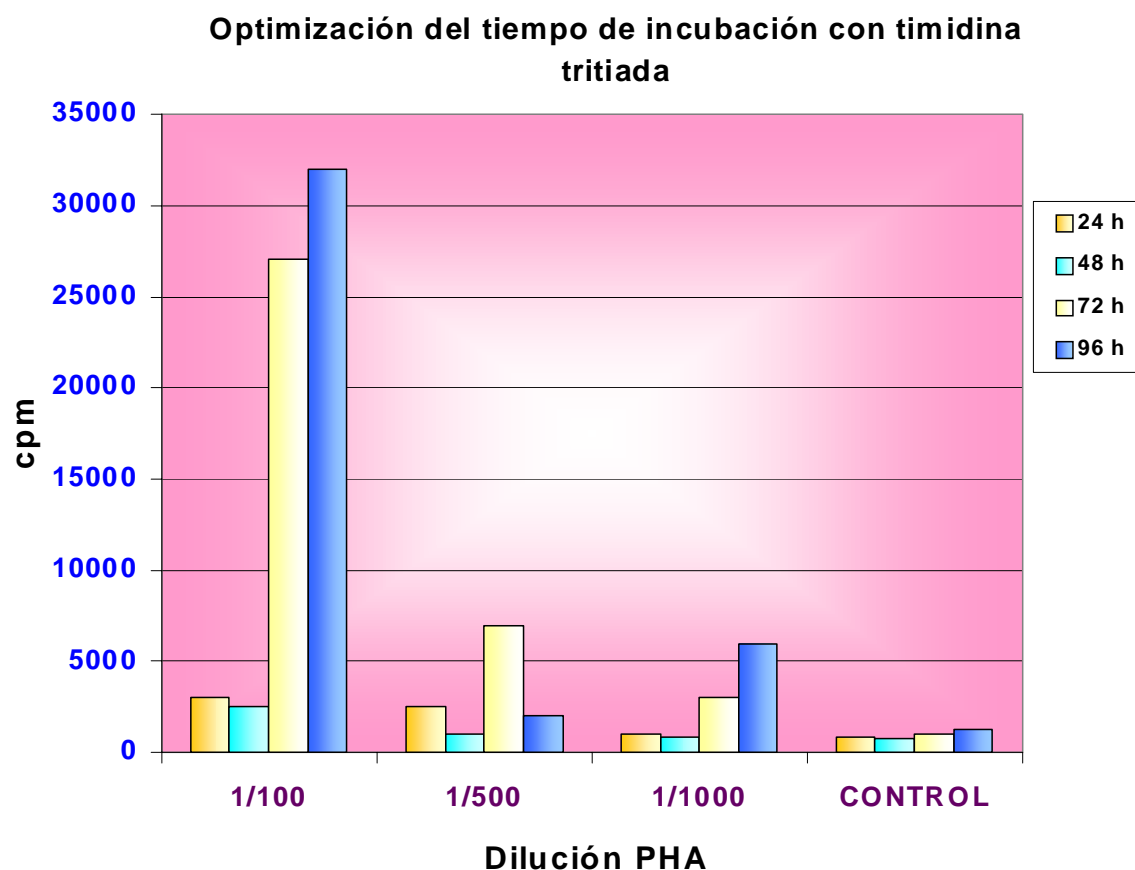


Figura 18.- Incorporación de H^3 -Timidina en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, a la concentración de 500.000 células/pocillo.

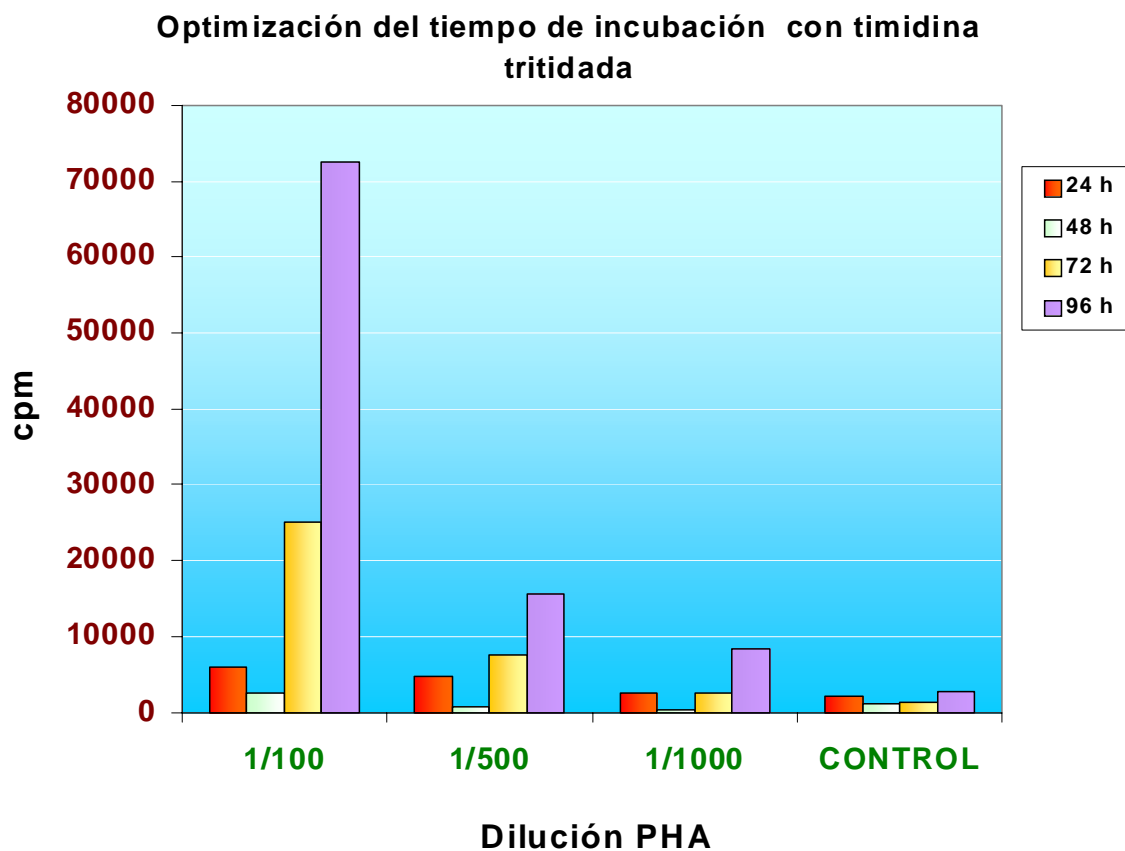


Figura 19.- Incorporación de H^3 -Timidina en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, a la concentración de 1.000.000 células/pocillo.

Como se puede comprobar, estas gráficas reflejan la incorporación de timidina tritiada en los cultivos de linfocitos después de 24h, 48h, 72h y 96h de incubación con diferentes concentraciones de fitohemaglutinina (PHA), observándose que el crecimiento es superior con la concentración mas elevada de PHA, es decir a la dilución 1/100, después de 96 horas de incubación.

Los histogramas que representan la fijación de ^3H -tim en cpm frente al tiempo de incubación en horas nos han permitido, pues, establecer el tiempo óptimo de incubación, que resulta ser de 96 horas, para el contaje de células binucleadas y la posible aparición de micronúcleos.

III.3.1.b.- Exposición de los cultivos celulares al campo magnético a estudio

Una vez preparadas las placas con los linfocitos, los metales a sus concentraciones correspondientes y la PHA-M, habiendo dejado tres pocillos sin metal y uno sólo con medio a modo de blanco, una de las dos placas se introduce en el solenoide, elaborado según el diseño descrito en el apartado III.1.1 del presente capítulo, y mantenido en estufa a 37 °C; la placa control se sitúa fuera del solenoide, a un lado de la cavidad de la estufa, puesto que los campos magnéticos están confinados estrictamente al volumen del arrollamiento y no se manifiesta, por consiguiente, su acción en este punto de la estufa. Se aplica el campo magnético de 50 Hz, inicialmente a la intensidad de 3,2 mT para, en experimentos consecutivos, ir aumentando dicha intensidad a 6,4 y 9,6 mT. A este fin se utiliza el circuito mostrado en la figura 7 de este capítulo.

Transcurridas 72 h, como ya se indicó, se añade citocalasina-B, continuándose después de este proceso la exposición, hasta completar un total de 96 h, al término de las cuales se suprime el campo magnético y se procesan las placas.

III.3.1.c.- Determinación de proliferación celular: el método del MTT

Existen diversos métodos de medida de la proliferación de células de mamíferos, por ejemplo los de conteo de células con o sin colorantes, los que miden la incorporación de nucleótidos radiactivos durante la proliferación celular, como el anteriormente descrito de la timidina tritiada. A pesar de que todos ellos pueden ser parcialmente automatizados y permiten el procesamiento de un número considerable de muestras, resulta difícil realizar con ellos un elevado número de ensayos al día. Así las cosas optamos, en su momento y a la hora de elegir un método para determinar la proliferación de los linfocitos, por uno que resultara a la vez rápido, fiable y que no implicara la necesidad de aparatos de los que no se disponía. El método del MTT resultó ser el que mejor respondía a las necesidades de nuestro experimento.

Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromito), que se da únicamente en células vivas; las sales de tetrazolio ponen de manifiesto, permitiendo su medida, la actividad de varias deshidrogenasas, al unirse el anillo de tetrazolio a la mitocondria activa, por lo que la reacción se da exclusivamente, como decíamos, en células vivas, capaces de convertir el sustrato, de color amarillo pálido, en cristales de formazán, fuertemente coloreados en azul. De esta manera resulta fácil, posteriormente, la lectura de la intensidad de color con un espectrofotómetro lector de placas multipocillo (96 pocillos).

El precipitado de formazán a que da lugar la reacción con células vivas no es soluble en el medio, de manera que se utiliza un alcohol con objeto de disolver los cristales y conseguir así una solución homogénea apta para las medidas de densidad óptica. Se utiliza el isopropanol con HCl, al haberse comprobado que es el más idóneo entre los disolventes orgánicos para este fin.

Por otra parte, el medio utilizado normalmente en cultivos celulares contiene rojo fenol, y por ello puede presentar colores variables según el pH. Para minimizar las interferencias que esto podría suponer, se convierte el rojo fenol en su forma totalmente ácida, de color amarillo (al igual que el MTT) acidificando el medio en la última fase del ensayo, una vez formados ya los cristales de formazán, con el mismo isopropanol. Esto hace que el ensayo se pueda llevar a cabo sin necesidad de pasos intermedios de lavado, con la agilización y minimización de variabilidad entre muestras que ello implica.²³⁷

- **Procedimiento:**

La solución de MTT (Sigma, Cat. M2128) se prepara disolviendo con PBS a razón de 2,5 mg/mL. Se filtra esta disolución mediante filtros de 0,22 μ (Millipore) a fin de eliminar precipitados, y se guarda en alícuotas, protegido de la luz, a -20°C. Este compuesto es altamente tóxico, por lo que debe manejarse siempre con guantes, procurando no originar aerosoles al utilizarlo; para ello es recomendable quitar el flujo laminar de la campana.

²³⁷ Mosman, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods*, 65, 1983: 55-63.

MATERIAL Y MÉTODOS

El isopropanol ácido se consigue mezclando 96 mL de alcohol isopropílico (Sigma) con 4mL de HCl 1N.

Se realiza el ensayo en placa de cultivo con 96 pocillos y un volumen final de 100 μ L por pocillo.

A las 96 horas de incubación de las placas en la cámara de campo magnético, y antes de procesarlas para el recuento de micronúcleos, se toman 100 μ L de cada uno de los 12 pocillos (tanto de la placa control como de la tratada) y se vierten en la placa de 96 pocillos, poniendo pocillos triplicados para cada punto del experimento. A continuación se añaden 20 μ L de la disolución de MTT a 2,5 mg/mL en PBS, de color amarillo, y se incuba la placa a 37°C en presencia de un 5% de CO₂ durante un tiempo variable de 2 a 4 horas, tras las cuales se apreciarán a simple vista los precipitados azules de formazán.

Transcurrido ese tiempo, se disuelven completamente los cristales mediante la adición de 100 μ L de la disolución de isopropanol ácido a cada pocillo, y resuspendiendo enérgicamente con micropipeta multicanal hasta conseguir una disolución homogénea.

Finalmente se realiza la lectura de la densidad óptica de las placas en espectrofotómetro Titertek Multiscan MCC/340 de Cultec, a 540 y 690 nm, siendo mayor la proliferación a mayor densidad óptica.

III.3.1.d.- *Determinación de inestabilidad genética mediante el ensayo homologado de micronúcleos con bloqueo citogenético (BC)*

Los métodos biológicos para la evaluación final de las dosis de radiación complementan las determinaciones físicas y pueden proporcionar información importante en los casos en que la dosimetría física no ha sido posible o no resulta fiable. Entre los métodos biológicos adoptados para determinar los daños causados por las radiaciones, el análisis citogenético es el más conocido. La presencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica se ha utilizado desde hace aproximadamente veinticinco años como indicador biológico sensible y fiable para radiaciones, principalmente ionizantes.²³⁸ La sensibilidad del método cromosómico mejoró considerablemente con la introducción de la técnica de diferenciación de cromátidas hermanas.²³⁹ No obstante, el tiempo requerido para la realización de esta técnica, así como el coste que supone, son elementos determinantes que limitan considerablemente su utilización.

Ello explica que, a la hora de elegir un método para la determinación del daño genético que pudiera derivarse del tratamiento con los campos magnéticos objeto de nuestro estudio, buscáramos un ensayo biológico comparable al análisis directo de las aberraciones cromosómicas en cuanto a sus ventajas

²³⁸ Lloyd, D.C., "Biological dosimetry in radiological protection: recent developments", *J. Soc. Radiol. Protection*, 1984: 4-5; Bauchinger, M., "Cytogenetic effects in human lymphocytes as a dosimetry system", en: Eisert, W.S.; Mendelsohn, M.L., eds., *Biological dosimetry: Cytometric approaches to mammalian systems*. Berlin, Springer- Verlag, 1984: 15-24.

²³⁹ Latt, "Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome", *Proc. National Acad. Sci.*, 70, 1973: 3395.

(sensibilidad y resolución), pero más rápido, sencillo y barato. La elección recayó en el ensayo de micronúcleos con bloqueo citogenético (BC), utilizado durante los últimos años en la valoración de la genotoxicidad de todo tipo de sustancias químicas. Este ensayo ha sido asimismo empleado para comprobar el efecto lesivo sobre el material genético de diversos agentes físicos, tales como los campos magnéticos,²⁴⁰ los rayos X,²⁴¹ las radiaciones ultravioletas de lámparas halógenas sin protección de cristal²⁴² y radiaciones de radiofrecuencia.²⁴³

Los micronúcleos son pequeños núcleos abortivos que aparecen después de la fragmentación de cromosomas (clastogenicidad) o tras la exposición de células a tóxicos. Se muestran como cuerpos redondos derivados de fragmentos cromosómicos, o de cromosomas enteros, cuyos centrómeros han perdido su afinidad por el huso mitótico. Representan una expresión de daño genético y son fácilmente identificables, incluso a pequeños aumentos; requieren una sola división celular para expresarse, lo que hace necesario, como se ha señalado anteriormente, bloquear, mediante la adición de citocalasina-B, la primera etapa de la mitosis en la citoquinesis para poder observarlos.

²⁴⁰ Scarfi, M.R.; Bernasi, F.; Cossarizza, A.; Monti, D.; Zeni, O.; Lioi, M.B.; Franceschetti, G.; Capri, M. y Franceschi, C., "50 Hz AC sinusoidal electric fields do not exert genotoxic effects (micronucleus formation) in human lymphocytes", *Radiat. Res.*, 135(1), Julio, 1993: 64-68.

²⁴¹ Fenech, M. y Morley, A.A., "Cytokinesis block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation", *Mut. Res.*, 161, 1986: 193-298.

²⁴² D'Agostini, F.; Izzotti, A. y De Flora, S., "Induction of micronuclei in cultured human lymphocytes exposed to quartz halogen lamps and its prevention by glass covers", *Mutagenesis*, 8, 1993: 87-89.

²⁴³ Garaj- Vrhoac, V.; Fucic, A. y Horvat, D., "The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vivo", *Mutat. Res.*, 281, 1992: 181-186.

- **Procedimiento:**

En primer lugar, para la realización del ensayo, las células a estudio deben ser fijadas y teñidas a fin de posibilitar el posterior conteo de micronúcleos. La fijación se realiza mediante centrifugación, tomando un volumen de 100µL de cada uno de los pocillos de las placas en las que se ha realizado el cultivo de linfocitos con BC y exposición a CM, de la manera que previamente se ha explicado, y colocándolos en el cono del sistema de centrifugación (centrífuga Cytospin-2, Shandon) sobre filtro y portaobjetos; se someten las muestras así preparadas a centrifugación de 400 rpm durante 8 min a temperatura ambiente.

Para la tinción, se ha utilizado el equipo de “Tinción rápida para hematología de Grifols”, que no es sino una modificación del método de Wright- Giemsa. Dicha modificación consigue convertir los cuatro minutos clásicos del proceso en tres etapas, lo que resulta en un proceso de tinción de quince segundos. Además de rapidez, esta tinción proporciona un elevado grado de versatilidad que no es posible alcanzar con los colorantes tradicionales.

Los reactivos de que consta el equipo de tinción son:

- 1) Una solución alcohólica como fijador.
- 2) Una solución ácida como primer colorante
- 3) Una solución básica como segundo colorante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Así pues, una vez totalmente secas las extensiones, se procede a la tinción diferencial de las células con el mencionado método, que consiste en sumergir el portaobjetos en la solución fijadora durante cinco segundos (5 inmersiones de 1 segundo); dejar escurrir el exceso de fijador antes de sumergir, de la misma forma (5 inmersiones de 1 segundo), el porta en el primer colorante (solución ácida); dejar escurrir de nuevo el exceso de colorante para, en último lugar, sumergir el porta en el segundo colorante (solución básica), de igual manera, durante cinco segundos. Finalmente se enjuaga el portaobjetos en cuestión con agua destilada y se deja secar antes de pasar al recuento de los micronúcleos.

Para el recuento de micronúcleos se ha utilizado un microscopio óptico tipo Dialux 20 EB (Leitz, Alemania), utilizando una magnificación de 400 aumentos y, en los casos de comprobación y discriminación, de hasta 1.000 aumentos con aceite de inmersión. Se estudian los linfocitos binucleados, bloqueados tras la primera división mitótica y que presentan su citoplasma conservado.²⁴⁴

Con la tinción empleada, el aspecto de los linfocitos es el de células con un citoplasma escaso de color azul claro y un núcleo con escotadura, que ocupa casi todo el citoplasma, de color violeta.

²⁴⁴ Fenech, M. y Morley, A.A., "Measurement of micronuclei in lymphocytes", *Mutat. Res.*, 147(1-2), Febrero-Abril, 1985: 29-36;

El criterio seguido a la hora de la identificación de micronúcleos es su diámetro, inferior al núcleo entre 1/16 y 1/3, de la misma naturaleza que éste, no refractarios, independientes del núcleo mayor y sin puentes. A fin de minimizar las diferencias en la frecuencia espontánea de micronúcleos descrita por diversos autores, se realiza el recuento sobre 500 células bloqueadas.²⁴⁵

III.3.2.- Estudio del efecto de campos magnéticos en tejido sanguíneo humano

Expondremos, a continuación, el desarrollo de los estudios *in vitro* encaminados a determinar la existencia de efecto en la exposición de sangre humana a la acción de campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) e intensidades variables (han sido utilizadas, en esta ocasión, las intensidades de campo de 1,6, 3,2 y 6,4 mT). Con este fin se realizaron cinco experimentos por cada intensidad de campo, mediante la evaluación y estudio comparativo de los parámetros bioquímicos y enzimáticos del tejido en cuestión.

La cámara generadora del campo magnético a estudio utilizada en esta fase del trabajo es la descrita en el apartado III.1.1 de este capítulo, al igual que en el caso de los cultivos celulares, y descrita como la “empleada en los estudios *in vitro*”.

²⁴⁵ Gantenberg, H.W.; Wuttke, K.; Streffer, C. y Muller, W.U., “Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo”, *Radiat. Res.*, 128(3), Diciembre, 1991: 276-281.

Para la realización de estos experimentos, se procedió de acuerdo a los pasos que a continuación se exponen.

III.3.2.a.- Obtención de sangre humana

Al igual que en los experimentos realizados con linfocitos, con el fin de asegurar una razonable homogeneidad en los resultados, la totalidad de las muestras de sangre humana utilizada en esta parte del estudio procede siempre de los mismos donantes voluntarios, en este caso dos, no fumadores, sin enfermedad conocida y, por ello, considerados sanos. La extracción se realiza, asimismo, de la vena cubital derecha, siendo depositada la sangre así obtenida en tubos estériles VACUTAINER de 4 mL (Becton Dickinson VACUTAINER Systems Eur., Francia) con Heparina-Litio, a fin de evitar la coagulación, y 2 mL de gel PSTTM, necesario para obtener posteriormente el suero mediante centrifugación.

III.3.2.b.- Incubación de la sangre en presencia del campo magnético a estudio a diferentes tiempos

Un mililitro de la sangre extraída es depositada en cada uno de los tubos anteriormente descritos, hasta completar un total de doce tubos. La mitad de ellos será expuesta a la acción del campo magnético de 50 Hz, colocándose en una gradilla en el interior del solenoide generador del campo en cuestión; los seis tubos restantes constituirán el control negativo, siendo colocados igualmente en

una gradilla que se situará en la misma estufa, pero fuera del alcance del campo magnético generado en el interior del solenoide. De esta manera los dos grupos de tubos se mantienen durante igual tiempo en idénticas condiciones de humedad y temperatura, que fijamos en 37°C.

Se establecen los distintos tiempos de exposición para cada pareja de tubos (control y tratado) en 0 horas (es decir, sin exposición a campo magnético), 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

Una vez transcurrido el tiempo indicado para cada par de tubos, y a fin de obtener el suero de las muestras, se centrifugan a 3.200 rpm durante 7 min. Esta operación se realiza sucesivamente a los tiempos ya citados de 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas, y siempre utilizando cada vez dos muestras, una control y otra tratada.

El proceso descrito se repite cinco veces para las intensidades de campo de 1,6, 3,2, y 6,4 mT respectivamente.

III.3.2.c.- Determinación de parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo

Una vez obtenido el suero sanguíneo como queda descrito, se determinan las concentraciones en el mismo de los parámetros bioquímicos y enzimáticos relacionados en las tablas 9 y 10, mediante los análisis realizados por el Instituto de Cardiología de la Comunidad Autónoma de Madrid.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tanto los parámetros bioquímicos como los enzimáticos, se determinaron mediante análisis de los sueros en un autoanalizador de bioquímica MEGA (Mitsubishi, Japón). Dicho aparato utiliza técnicas bi-reactivas colorimétricas, cinéticas y fotométricas, realizando numerosas lecturas de cada muestra tras la reacción oportuna para cada parámetro. Las mencionadas lecturas son comparadas con una curva de calibración, resultante de las calibraciones practicadas diariamente por triplicado.

Lo anteriormente expuesto, sumado a la automatización en todos los pasos de los distintos métodos (ya que cada parámetro requiere una técnica diferente, con diversos reactivos), además de los controles, tanto internos como externos, que se realizan diariamente, aseguran una gran precisión y velocidad en los análisis, lo que redunda en una mayor calidad y eficacia de trabajo.

Parámetros bioquímicos		
Albúmina	Fósforo	Magnesio
Bilirrubina total	Glucosa	Proteínas totales
Calcio sérico	Hierro sérico	Urea

Tabla 9: Parámetros bioquímicos analizados en los sueros a estudio.

Parámetros enzimáticos	
LDH	GOT
Fosfatasa alcalina	GPT
CPK	Gamma- GT

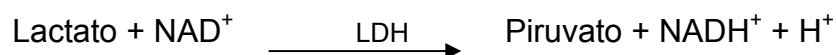
Tabla 10: Parámetros enzimáticos analizados en los sueros a estudio.

El autoanalizador consta de dos cámaras frigoríficas en las que se sitúan los pares de reactivos que se utilizan en las técnicas de determinación de parámetros bioquímicos y enzimáticos en suero sanguíneo, al ser casi la totalidad de estas técnicas bi-reactivas. La base de las determinaciones es, pues, poner en contacto los reactivos específicos para cada tipo de parámetro con los sueros a analizar, lo que provoca una reacción concreta en cada caso; estas reacciones son, generalmente, colorimétricas.

Ya que resultaría prolijo en exceso, y no es el tema que nos ocupa, ofrecemos, a modo de ejemplo, las reacciones en que se basan las determinaciones de alguno de los parámetros reflejados en las tablas anteriores, de los que más adelante nos ocuparemos con detalle a la hora de exponer los resultados de los análisis.

- Determinación de las concentraciones de Lactato Deshidrogenasa (LDH):

Se realiza mediante una prueba cinética por UV para analizadores de Química Clínica. El método está basado en las recomendaciones de la “Federación Internacional de Química Clínica” (IFCC) y de la “Sociedad Alemana de Química Clínica” (GSCC, 1994). El principio de la reacción es el siguiente:



- Determinación de las concentraciones de Proteínas totales:

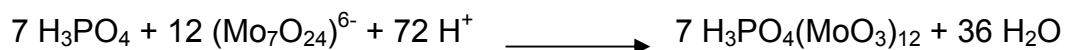
Se utiliza para ello el Método Biuret, prueba colorimétrica para analizadores de Química Clínica, cuyo fundamento es la reacción de los iones cobre con las proteínas en medio alcalino, que da lugar a un complejo de color púrpura. La absorbancia de este complejo es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

- Determinación de las concentraciones de Fósforo inorgánico:

Se lleva a cabo mediante una prueba fotométrica por UV para analizadores de Química Clínica. La prueba se basa en la reacción del fosfato con molibdato en medio fuertemente ácido para formar un complejo, cuya

MATERIAL Y MÉTODOS

absorbancia en el UV cercano es directamente proporcional a la concentración de fosfato. El principio de la reacción que tiene lugar es:



De la misma manera que en los casos expuestos, cada uno de los parámetros analizados tiene su propio método de determinación (comercializados por la casa Olympus System Reagent) que, como ya se ha manifestado, no vamos a entrar a detallar, al no ser este el objeto de nuestro estudio, sino tan solo un medio para llevar a cabo el ensayo que nos ocupa.

III.4.- EXPERIMENTOS *IN VIVO*

III.4.1.- Estudio de las variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, originadas por la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz)

En este punto de la investigación los experimentos se encaminan a la comprobación, *in vivo*, de la hipótesis según la cual los campos electromagnéticos de baja frecuencia tendrían la capacidad de provocar variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, induciendo en consecuencia un desequilibrio homeostático que podría derivar en la aparición de tumores cerebrales, entre otros trastornos de distinta severidad; dicha hipótesis, como ya se ha mencionado, ha sido apuntada por trabajos anteriores en radiofrecuencia.²⁴⁶

La consecución de este objetivo -comprobar, *in vivo*, el efecto que un campo magnético de frecuencia extremadamente baja puede ejercer en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones- pasa por la exposición de éstos a la radiación de un campo magnético de 27,5 Oersted (2,75 mT) y 50 Hz, generado por la cámara previamente descrita en el apartado III.1.2 de este capítulo.

²⁴⁶ Neubauer, C. et al., "Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz...", op. cit., 261-268; Salford, L.G. et al., "Permeability of the blood-brain barrier...", op. cit., 535-542.

Por otra parte se pretende evidenciar, por esta nueva vía, la existencia, en su caso, de sinergismo entre la toxicidad del plomo (hablaremos aquí de neurotoxicidad) y la presencia de los campos magnéticos de baja frecuencia ya mencionados. El compuesto de plomo utilizado para tal fin es el referido en el apartado III.2 de este capítulo.

Se realizaron cinco repeticiones del experimento, constando cada una de ellas de doce animales de experimentación, y siguiendo el procedimiento que a continuación se expone.

III.4.1.a.- Animales de experimentación

Se utilizaron ratones Balb/C hembra jóvenes, de 20 ± 2 g, mantenidos en cajas metabólicas con dieta de pienso estándar y agua “ad libitum”, verificándose el cumplimiento de todos los extremos expresados en las normativas del RD 223/1988 del 14 de Marzo y de la Orden del 13 de Octubre de 1989 (BOE del 18 de Octubre), así como en la Directiva de la Comunidad Europea 86/609/CEE, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los animales se distribuyeron en dos jaulas, en grupos de 6 ratones, y todos ellos se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, humedad y duración del ciclo luz/oscuridad (12/24h), siendo una de las jaulas expuesta a la

acción del campo magnético a estudio y constituyendo la otra el grupo control no expuesto, como refleja la figura 20.

III.4.1.b.- Disolución del compuesto metálico Pb (NO₃)₂, y administración

En cada uno de los grupos de ratones, control y expuestos a campos magnéticos, dos animales son inyectados por vía intraperitoneal con el compuesto de plomo elegido y caracterizado en el epígrafe III.2 de este capítulo.

Se administra Pb (NO₃)₂ a la concentración de 0,1 mg por kilogramo y día, en solución salina fisiológica 0,8%, a partir de una disolución madre de 1 mg/mL; mediante jeringuilla de insulina con divisiones de 0,01 mL. Ya que el peso de los animales es de unos 20 g, se administran por vía intraperitoneal 0,002 mg de Pb(NO₃)₂.

III.4.1.c.- Exposición de los animales a la acción del campo magnético a estudio

La jaula con el grupo de ratones que serán expuestos se coloca geométricamente en el interior de los dos anillos que generan y confinan el campo electromagnético; la otra jaula, con los animales control, se sitúa a un metro de distancia en idénticas condiciones ambientales.

De esta manera, los animales en el interior del solenoide son sometidos a un campo electromagnético (convenientemente evaluado mediante dos gráficas:

de potencia de campo magnético y de frecuencia, como anteriormente se describió), de 27,5 Oersted (2,75 mT; 275 voltios), con una frecuencia de 50 Hz, durante 7 días (168 horas). Este experimento se repite, como ya dijimos, cinco veces.

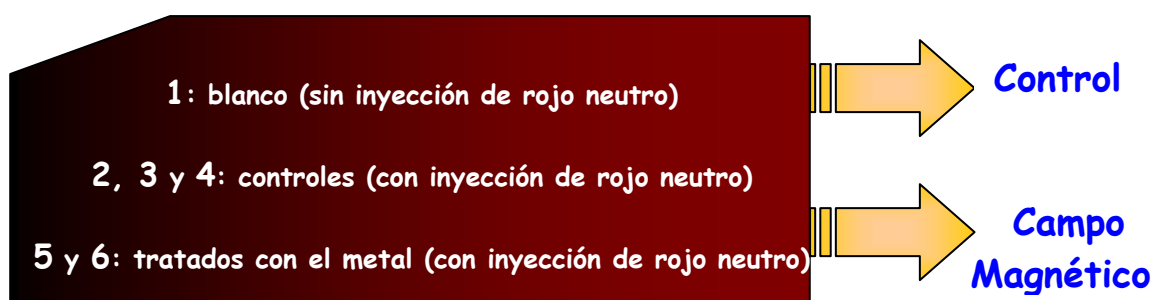


Fig. 20.- Disposición y tratamiento de los grupos de ratones en las dos jaulas.

III.4.1.d.- Disección y muestreo. Cuantificación espectrofotométrica

Una vez transcurrido el tiempo de exposición debe procederse a la disección de los animales a fin de extraer el cerebro y preparar el extracto que nos permitirá estudiar los efectos que haya podido tener el campo magnético aplicado.

Previamente, y con el objeto de poder en su momento comparar el paso del colorante elegido, mediante espectrofotometría, comprobando así las posibles variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, se administra

MATERIAL Y MÉTODOS

dicho colorante, el rojo neutro²⁴⁷ (Sigma, Ref: 7005) al 0,1%, que se disuelve a razón de 5 mg en 1 mL de agua destilada. La administración se realiza por vía intravenosa, inyectándose 0,2 mL (lo que equivale a 1 mg de rojo neutro) en la vena dorso-lateral de la cola a todos los animales, con excepción de un control de cada jaula que servirá posteriormente como blanco para la lectura del pico del rojo fenol en los espectros visible y ultravioleta. Transcurridos treinta minutos, con objeto de dar tiempo al colorante a llegar al cerebro, se procede al sacrificio de los animales por dislocación cervical.

Una vez sacrificados los animales, se realiza la disección del cerebro, desechando el cerebelo, mesencéfalo y la médula oblongada; los cerebros obtenidos de esta manera son enjuagados con solución fisiológica (NaCl al 0,8%), secados en papel de filtro y pesados.

La homogeneización se lleva a cabo en tubos de plástico de 5 mL, mediante trituración (UltraTurrax T-25, de Jankel & Kunkel, Alemania) con la disolución salina fisiológica ya mencionada, en la proporción de 1:2 (p:v); finalizada la homogeneización se centrifugan las muestras en tubos Eppendorf de 1,5 mL a 13.500 rpm durante 10 minutos, a fin de retirar las partículas sólidas, en Minifuge Heraeus (Les Ulis, Francia).

Los sobrenadantes son filtrados a través de filtros (Millipore) con tamaño

²⁴⁷ 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina hidrocloreto (C₁₅H₁₆N₄ • HCl).

de poro de 0,45 μ de diámetro antes de registrarse su espectro visible en un espectrofotómetro (VARIAN Cary 300 Bio, monitorizado mediante el programa CaryWin-UV de VARIAN), a 540 nm para cuantificar en ellos el pico correspondiente al rojo neutro.

- **Determinación del espectro de absorción del rojo neutro**

La determinación de la longitud de onda a la que absorbe el rojo neutro, es decir, la absorbancia a la que este compuesto presenta un máximo, se estableció con anterioridad como a continuación se describe.

Se trataba, inicialmente, de decidir la región del espectro más apta para nuestros propósitos, para lo que se realizaron en primer lugar, tanto en agua como en solución salina fisiológica (NaCl 0,8%), diferentes diluciones del rojo neutro (desde 0,1 a 0,0001 mg/mL con cada disolvente); a continuación se leyó su absorbancia en la región del visible y en la del ultravioleta, valiéndonos del espectrofotómetro VARIAN Cary 300 antes citado. La concentración apta para lectura resultó ser la de 5 μ g/mL, ya que a concentraciones mayores se daba una respuesta excesiva que el aparato no recogía, y al revés en concentraciones inferiores.

Las gráficas resultantes, que se exponen en el capítulo siguiente, muestran un pico a la longitud de onda de 540 nm en la región visible del espectro, y otro a 275 nm.

Ya que las proteínas absorben a 280 nm, y a fin de evitar interferencias, elegimos para nuestro experimento la longitud de 540 nm.

El extracto sobrenadante del cerebro control (en ausencia de campo electromagnético y sin inyección de rojo neutro) se toma con blanco para la lectura del pico del rojo fenol, en el espectro visible y ultravioleta, de cada una de las muestras.

III.4.2.- Determinación de las alteraciones de las propiedades eléctricas de tejidos de rata mediante irradiación con campos electromagnéticos de radiofrecuencia

Se pretende, con esta etapa del estudio, establecer las propiedades eléctricas (conductividad y permeabilidad) de distintos tejidos de ratas tratadas con dosis tóxicas de hierro y plomo mediante irradiación con campos de radiofrecuencia, modulados a 2,45 GHz.

A tal efecto se utilizó la cámara de campos electromagnéticos de radiofrecuencia descrita en el párrafo III.1.3 del presente capítulo, así como los compuestos metálicos de hierro y plomo caracterizados en el apartado III.2 del mismo.

Por lo demás, el experimento, repetido en tres ocasiones, se desarrolló como a continuación se indica.

III.4.2.a.- Animales de experimentación

Se utiliza un total de 45 ratas macho de la raza Wistar, con una media de pesos de 175 ± 30 g. Los animales son mantenidos en jaulas metabólicas y alimentados con pienso estándar y agua “ad libitum”, verificándose en todo momento el cumplimiento íntegro de los extremos expresados en las normativas del RD 223/1988 del 14 de Marzo y de la Orden del 13 de Octubre de 1989 (BOE del 18 de Octubre), así como en la Directiva de la Comunidad Europea 86/609/CEE, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Se formaron con las ratas dos grupos que fueron mantenidos en iguales condiciones de temperatura, humedad y duración del ciclo luz/oscuridad (12/24h). De estos dos grupos, el primero, cuyos animales no recibieron tratamiento químico alguno, constituye el que denominaremos grupo control, compuesto por 5 ratas; El segundo, estuvo formado por 10 ratas que se tratan con disoluciones estériles de los metales a estudio, a la concentración de 1mg/mL. La distribución de las ratas en las jaulas y sus diferentes tratamientos se reflejan en la figura 21.

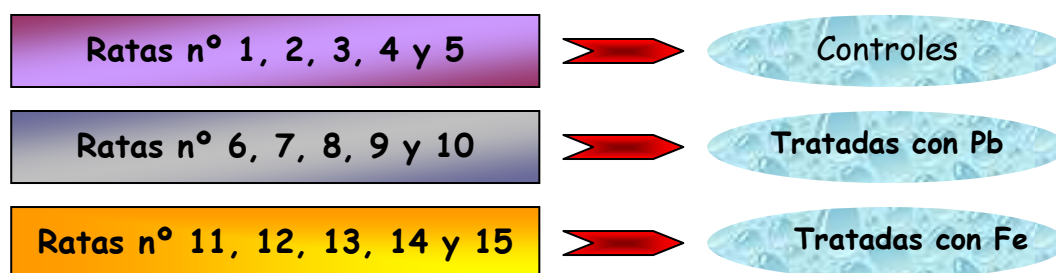


Fig. 21.- Distribución de las ratas en las jaulas y sus diferentes tratamientos.

III.4.2.b.- Administración de los compuestos metálicos

Los animales tratados son inyectados diariamente con una dosis intraperitoneal del metal correspondiente empezando por dosis bajas, de 0,1 mL, para llegar paulatinamente a 1mL, durante 12 días. Las dosis son incrementadas diariamente en 0,1 mL, siempre que el estado del animal lo permite, hasta alcanzarse la dosis máxima de 1mL que, en caso de lograrse antes del término del tratamiento, sigue administrándose hasta completar el ciclo de dicho tratamiento (de 12 días, como hemos referido). De esta manera, las dosis administradas fueron rebajadas en las ocasiones en que un individuo sufrió una disminución de peso tras la administración previa, a fin de que pudiera recuperar su equilibrio homeostático. Gracias a ello, y como veremos a continuación, el peso de los animales evoluciona de manera similar en todos los casos

1. Plomo

La disolución se preparó a partir del producto descrito en el apartado III.2 del presente capítulo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, que se disolvió en agua destilada a fin de obtener una concentración de 1mg/mL, y fue posteriormente filtrada a través de filtro Millipore con tamaño de poro de 0,45 μ .

MATERIAL Y MÉTODOS

La disolución así preparada es inyectada a continuación, mediante jeringuilla de insulina estéril, por vía intraperitoneal a los animales a tratar. La evolución de las dosis de plomo a lo largo del tiempo se plasma en la figura 22.

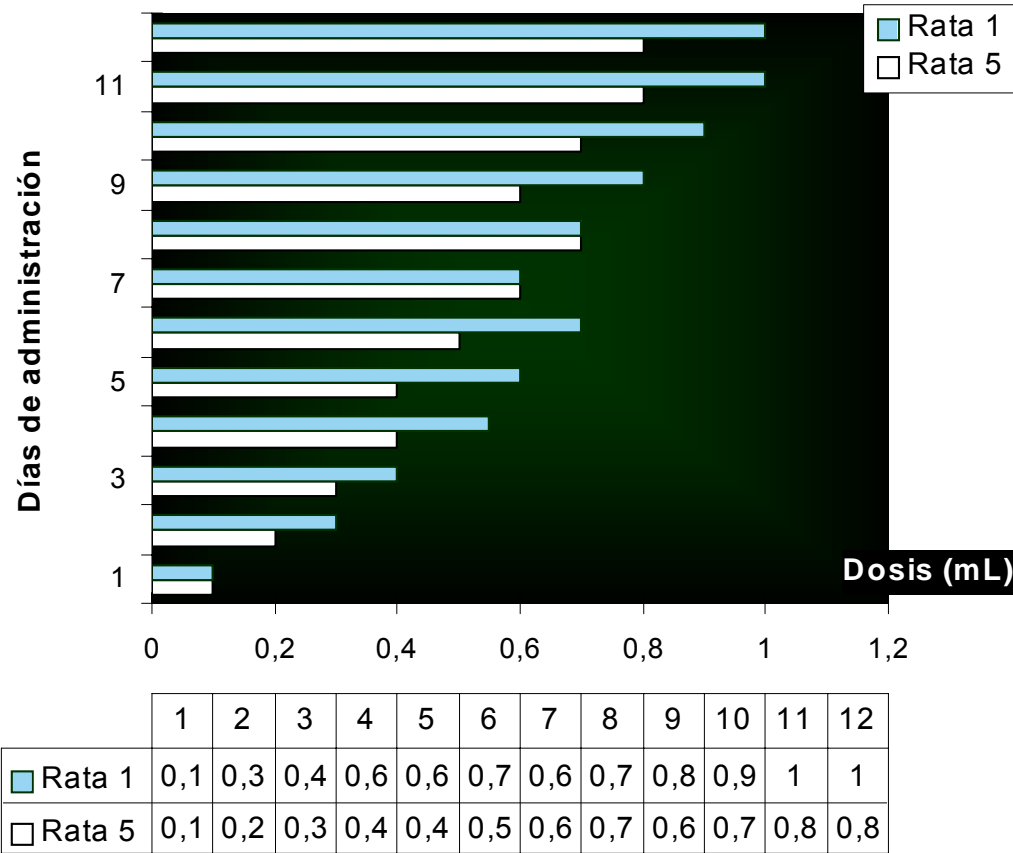
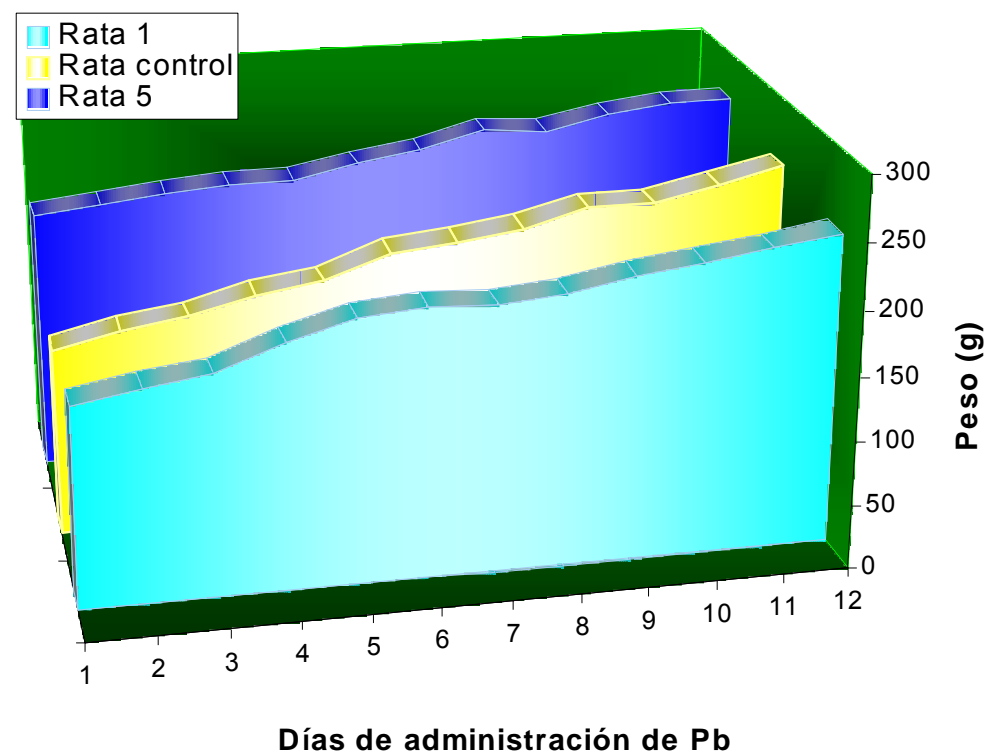


Fig. 22.- Administración de dosis de plomo en mL/día.

Ya que los organismos responden de manera diferente a las agresiones externas, la evolución de los pesos de cada individuo condicionó la de las dosis, por lo que no sería veraz el presentar aquí una

MATERIAL Y MÉTODOS

media de las dosis administradas, al resultar las variaciones demasiado grandes. En lugar de ello hemos preferido, en las representaciones gráficas, reflejar las evoluciones en el tiempo de las dosis de plomo administradas y el consecuente crecimiento de dos de los animales, el de menor peso inicial (rata 1) y el de mayor (rata 5) de los tratados con este elemento, como se puede apreciar en la figura 23.



Días/peso(g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rata control	145	157	164	177	184	202	207	214	227	227	238	249
Rata 1	155	165	171	190	204	208	206	211	220	226	233	240
Rata 5	204	210	215	219	219	230	237	250	246	256	263	263

Fig. 23.- Evolución del peso en ratas tratadas con plomo.

2. Hierro

La disolución se preparó, como ya se indicó en el caso del plomo, a partir del Fe SO₄ caracterizado en el apartado III.2 de este capítulo, que se disolvió en agua destilada para obtener una concentración de 1mg/mL. Se administró a los animales con jeringuilla de insulina estéril, por vía intraperitoneal. El desarrollo de los animales, en relación con las dosis de metal administradas a lo largo del tiempo de tratamiento, se refleja en las figuras 24 y 25.

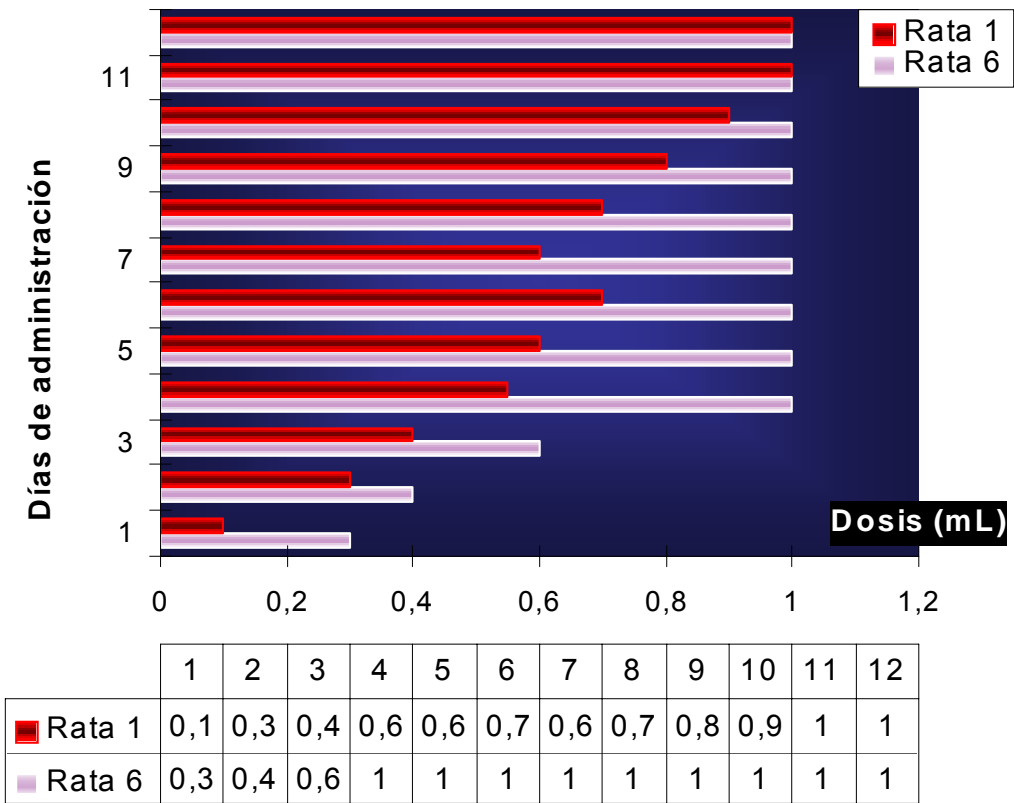
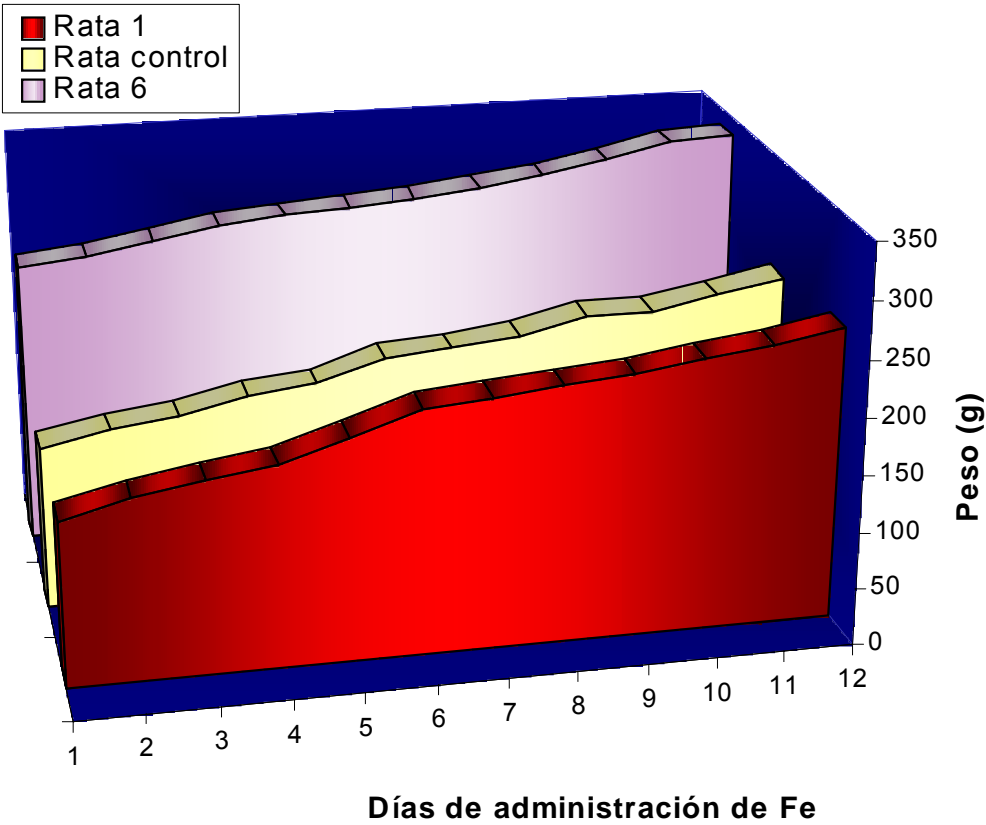


Figura 24.- Administración de dosis de hierro en mL/día.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tal y como se explicó al exponer la metodología de la administración del plomo, en el caso del hierro, asimismo, la evolución del peso de los animales condicionó las dosis de metal administradas a cada uno de ellos; de manera que, por los motivos antes expuestos, en estas gráficas hemos optado por reflejar la evolución del peso en relación a las dosis únicamente de dos de los animales, el menor (rata1) y el mayor de ellos (rata 6) al inicio del experimento.



Días/peso(g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rata control	145	157	164	177	184	202	207	214	227	227	238	249
Rata 1	145	160	170	178	195	215	220	226	231	239	247	258
Rata 6	253	260	269	280	285	288	293	299	307	318	330	333

Figura 25.- Evolución del peso en ratas tratadas con hierro.

III.4.2.c.- Análisis de sangre de las ratas tratadas con metales

Una vez transcurrido el tiempo que fijamos para el tratamiento con los metales, los animales son sacrificados, previa anestesia con éter, por extracción total de sangre mediante punción cardíaca. La sangre extraída a cada animal se distribuye en dos tubos de plástico estériles, uno de ellos con EDTA (K_3), (Vacutainer, Becton Dickinson VACUTAINER Systems Eur., Francia, 15057), para realizar recuentos celulares, y al que se añade un volumen de 2mL de sangre, y otro que contiene 2 mL de Gel PSTTM y heparina-litio ((Vacutainer, Becton Dickinson VACUTAINER Systems Eur., Francia, 15060), al que se añaden 4 mL de sangre. Este último tubo se centrifuga a 2.500 rpm durante 7 minutos, analizándose en el sobrenadante sérico los parámetros bioquímicos y las enzimas que a continuación se detallan:

- a) Parámetros hematológicos: eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas.
- b) Parámetros bioquímicos: glucosa, urea, proteínas totales, albúmina, bilirrubina total, magnesio, calcio sérico, hierro sérico y fósforo.
- c) Enzimas: transaminasas: GOT, GPT, Gamma-GT, LDH y CPK.

Para la realización de los análisis de parámetros enzimáticos y bioquímicos se utiliza el autoanalizador MEGA (Mitsubishi) del Instituto de

Cardiología de la Comunidad Autónoma de Madrid, cuyas características y funcionamiento se detallaron en el apartado III.3.2.c. del presente capítulo.

Los análisis hematológicos son, asimismo, llevados a cabo por el mencionado Instituto de Cardiología de la Comunidad Autónoma de Madrid, mediante un COULTER MAXM de la firma Beckman.

Este analizador, mediante un sistema de aspiración, toma un volumen fijo de sangre, que posteriormente diluye con líquido isotónico (isotón).

El Coulter consta de dos cámaras, la primera de las cuales contiene un hemolizante, a fin de determinar la hemoglobina contenida en los hematíes, una vez rotos, mediante la reacción de la cianmetahemoglobina. Asimismo se lleva a cabo el recuento de leucocitos y plaquetas, distinguiéndose las diferentes poblaciones de leucocitos por su tamaño. La segunda cámara discrimina, en función a su tamaño, los hematíes del resto de las células sanguíneas, realizando así el recuento de los mismos. Es también estimado el volumen corpuscular medio de hematíes, leyéndose directamente el tamaño de cada célula. El valor hematocrito se determina en función de los anteriores resultados.

Tras la extracción de sangre bajo anestesia, y muerte de los animales, se practica la necropsia, diseccionándose los siguientes órganos: hígado, corteza cerebral, pulmón, riñón, páncreas, músculo (de la zona femoral) y testículo.

Posteriormente, tras ser lavados los restos de sangre en disolución salina NaCl 0,8% y secados en papel de filtro, estos órganos se pesan antes de realizarse cortes de cada tejido de 2mm de grosor, que se colocan en placas Petri, mantenidas a 0°- 4° C hasta el momento de proceder a las mediciones de la permitividad y conductividad eléctrica.

III.4.2.d.- Determinación de la acumulación de metal en los órganos: ICP-MS

Por otra parte, una cantidad de cada tejido se congela para ser posteriormente evaluada, mediante análisis con ICP-MS (plasma de acoplamiento inductivo asociado a espectrómetro de masas), la cantidad de metal acumulado en cada órgano, a fin de determinar la influencia de éstos en las posibles variaciones de las características eléctricas de los tejidos. La citada evaluación de trazas de metal en los órganos fue llevada a cabo por nosotros en el Instituto de Ecología Química de la Gesellschaft Strahlenforschung (GSF) de Munich, Alemania.

Para ello se procesan las muestras homogeneizándolas en UltraTurrax T-25 (de Jankel & Kunkel, Alemania) y se retiran las partículas sólidas por centrifugación con centrífuga Heraeus Minifuge (Les Ulis, Francia). La extracción fue seguida de ultra-centrifugación utilizando una ultra-centrífuga modelo HimaCS 120 GX (de Hitachi, Tokio, Japón). A continuación se procedió a la detección de los metales valiéndonos de un espectrómetro de masas- ICP Elan 6000 (SCIEX, Concord. ON, Canadá), equipado con un nebulizador microconcéntrico

MATERIAL Y MÉTODOS

(MicroMist), cámara de spray refrigerada (Glass Expansion, Romainmotier, Suiza) y un juego de conos de Pt-Rh. El flujo fue suministrado por una bomba peristáltica a través de una pieza en forma de T situada entre la columna y el nebulizador. Se añadió oxígeno al flujo gaseoso. Los datos fueron procesados mediante el software Turbochrom (Perkin- Elmer).

En cuanto a los productos químicos empleados se utilizó, en esta fase del experimento, acetonitrilo calidad LC (Sigma- Aldrich), y agua purificada a la resistividad de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, usando para ello un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). El nitrógeno líquido necesario (99,996%) fue evaporado *in situ* y suministrado a $2,75 \times 10^5 \text{ Pa}$. La solución tamponadora utilizada se preparó disolviendo 5 mmol l^{-1} de acetato de amonio en agua o en agua-acetonitrilo (50/50; v/v), y ajustando el pH a 6,0 con ácido acético. Los tampones fueron desgasificados burbujeando helio, a fin de eliminar el oxígeno que pudiera haber disuelto en ellos y conseguir así un medio no oxidante.

Al no ser el análisis elemental mediante plasma de acoplamiento inductivo asociado a la espectrometría de masas una técnica muy común, debido principalmente a su reciente incorporación a la analítica (en los años ochenta), así como al elevado coste del equipo, vamos a exponer a continuación, brevemente, las bases y funcionamiento de la misma.

ICP-MS: bases de la técnica

Las técnicas instrumentales clásicas para el análisis elemental inorgánico han sido, primeramente, la Absorción Atómica de Llama (“AA” o “FAA”, Flame Atomic Absorption), y posteriormente el Plasma de Acoplamiento Inductivo (“ICP”, Inductively Coupled Plasma), asociadas con sistemas ópticos dispersivos para la separación del espectro atómico generado.

La Espectrometría de Masas combina las cualidades requeridas de alta sensibilidad, resolución adecuada, práctica ausencia de interferencias espectrales, análisis multi- elemento, rapidez, etc., por lo que se intentó, desde el inicio, dotar al espectrómetro con una fuente de ionización apropiada para el análisis elemental. Las cualidades ideales de la fuente a asociar al espectrómetro de masas serían: que fuese capaz de disociar completamente la muestra, producir con alto rendimiento iones monoatómicos con una sola carga y generar pocos iones poliatómicos o con múltiple carga. Esto no parece factible si se trabaja en vacío, ya que si se utiliza energía suficiente como para ionizar las especies más refractarias, resulta inevitable alcanzar el segundo o tercer potencial de ionización de otros elementos.

Al volver la vista hacia fuentes disponibles capaces de trabajar a presiones más altas se pensó en la ICP, un plasma de gas inerte a presión atmosférica, que cumple básicamente los requisitos mencionados.

El siguiente problema que esta solución planteaba era el de cómo extraer los iones presentes en el plasma, a presión atmosférica y temperaturas elevadísimas, e introducirlos en el espectrofotómetro de masas que, como sabemos, opera a alto vacío y temperatura ambiente o moderada. Esto se consiguió mediante el diseño de interfases apropiadas entre los dos aparatos, como se verá a continuación al describir las distintas partes que constituyen el equipo.

1.- El plasma o la antorcha: el plasma de acoplamiento inductivo se consigue sometiendo un flujo de gas, que llamaremos gas plasmógeno, a la acción de un campo magnético oscilante, inducido por una corriente de alta frecuencia; esto produce una liberación de energía por efecto Joule que permite alcanzar temperaturas de hasta 8.000 °K en las zonas de máxima corriente circular. El plasma confinado en el campo magnético normalmente se denomina “antorcha” o “llama” por la alta radiación luminosa que produce. Generalmente se utiliza el argón como gas plasmógeno.

El plasma se confina en un sistema de tres tubos concéntricos, habitualmente de cuarzo, abiertos por un extremo a la presión atmosférica. Por el tubo interior, denominado “inyector”, se hace llegar la muestra, en forma de aerosol procedente de un sistema nebulizador, al interior de la antorcha. A través de la cámara formada por los dos

tubos exteriores, se transporta el argón en régimen de flujo turbulento, destinado a sustentar el plasma. Este flujo de argón cumple también la segunda misión de refrigerar las paredes del tubo exterior, para evitar de esta manera su fusión por las altas temperaturas alcanzadas en la antorcha. Se genera, de esta manera, un gran número de iones y electrones acelerados por efecto de la alternancia del campo magnético.

2.- Extracción y óptica de enfoque: la zona de extracción es aquella donde se ponen en contacto la antorcha, que contiene los iones a analizar, y el espectrómetro de masas encargado de analizarlos.

El primer cono, o de muestreo, posee un orificio central de alrededor de 1 mm, a través del cual fluyen los iones de la llama formando un aerosol supersónico, favorecido por el pre-vacío reinante en la primera cámara. La parte central de este aerosol, o una porción mayor en el caso de emplearse algún campo electrostático, pasará por el orificio del segundo cono, o “skimmer”. Todo este proceso ocurre a gran velocidad, debido al alto gradiente de vacío creado a través de las sucesivas cámaras, por lo que la posible discriminación de las masas ligeras, preferencialmente arrastradas y eliminadas por el vacío, será muy pequeña.

Los dos conos están mecanizados en una aleación especial de níquel o en platino, y montados sobre un soporte refrigerado por un circuito de agua. La interferencia del metal vaporizado procedente de los conos a la señal de fondo es mínima, no afectando prácticamente al análisis.

A continuación de los dos conos de muestra iniciales se sitúa una óptica de extracción y enfoque iónico que, mediante campos electromagnéticos adecuados, produce un haz de iones colimado. Asimismo se dispone de una barrera fotónica a fin de evitar el ruido de fondo debido a fotones procedentes de la antorcha que puedan llegar al detector dispuesto, por la misma razón, fuera del eje “óptico” del espectrómetro.

3.- Espectrómetro de masas: los tipos de analizador actualmente empleados en ICP-MS son, en orden creciente de especificaciones, el cuadrupolo simple, el cuadrupolo con prefiltro y postfiltro, y el sistema magnético de doble enfoque para alta resolución.

En la figura 26 se muestra un esquema general de un equipo ICP-MS típico, con la indicación de las partes fundamentales por las que está constituido y que se acaban de exponer.

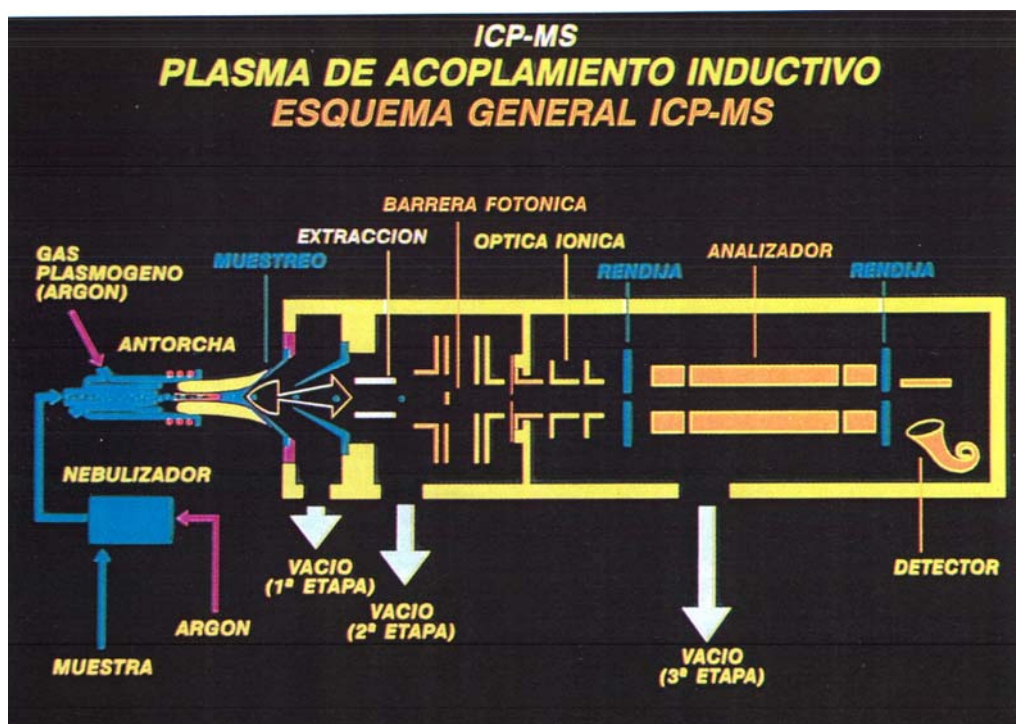


Fig. 26.- Esquema general del equipo ICP-MS (Por: Luis Esteban, *La espectrometría de Masas en imágenes*, ACK, eds., ISBN: 84-87687-18-0, 1993: 199)

Se pueden resumir las cualidades más importantes de la técnica en sus límites de detección bajísimos (del orden de ppt para la mayoría de los elementos); análisis rápido (en muestras desconocidas pueden determinarse en pocos segundos los componentes mayoritarios, minoritarios y elementos traza); identificación inequívoca (espectros muy sencillos, con muy pocas líneas, permiten una identificación fácil, incluso en presencia de matrices complicadas); determinación directa de relaciones isotópicas (medida rápida, efectiva y barata de relaciones isotópicas, con precisiones del orden de 0,1%); análisis elemental preciso (con bajos niveles de interferencia y capacidad de dilución isotópica); alto

nivel de automatización (sólo es necesaria una mínima intervención del operador); tratamiento previo mínimo (generalmente no se requiere separación química previa) y versatilidad (disponibles métodos de introducción de muestra adecuados para casi todos los casos, incluidas muestras sólidas por ablación con láser).

Desde el nacimiento de la técnica ICP-MS, en 1983-1984, se ha avanzado mucho en el diseño de ópticas de extracción y enfoque adecuadas que, aun estando muy lejos de conseguir, hoy por hoy, una eficacia óptima, asociadas con espectrómetros de masas cuadrupolares consiguen límites de detección de ppt (partes por trillón) para la mayoría de los elementos, e incluso del orden de las ppq (partes por cuatrillón) cuando se utilizan espectrómetros de masas magnéticos de alta resolución.

Dada la gran popularidad y difusión que la técnica ICP-MS ha adquirido en los últimos años, son muy numerosos los grupos de investigación dedicados en la actualidad a este tema, por lo que no hay duda de que se continuará mejorando el ya muy satisfactorio nivel de costo y especificaciones alcanzado por estos instrumentos.

Las condiciones y características del ICP- MS utilizado en la determinación de metales en nuestras muestras se reflejan en la tabla 11.

ICP- MS: condiciones óptimas	
Instrumento	Elan 600
Cono de muestreo	Pt- Rh (10%) (orificio:1mm)
Skimmer	Pt- Rh (10%) (orificio: 0,4mm)
Potencia Rf	1.300 W
Flujo de gas plasmógeno	151 L.min ⁻¹
Flujo de gas auxiliar	11 L.min ⁻¹
Flujo de gas nebulizador	0,91 L.min ⁻¹
Flujo de oxígeno	20 ml.min ⁻¹
Temperatura de la cámara de spray	+ 2°C
Isótopos monitorizados	²⁰⁶ Pb, ²⁰² Hg, ⁵⁶ Fe, ¹¹⁴ Cd

Tabla 11.- Condiciones óptimas del ICP-MS utilizado en la determinación de metales de las muestras de tejidos de rata.

III.4.2.e.- Determinación de la permitividad dieléctrica compleja de los tejidos a estudio

Como ya se indicó en el momento de describir las distintas cámaras generadoras de campos magnéticos en el epígrafe III.1.3 de este capítulo, a la hora de determinar las propiedades eléctricas de los tejidos de rata procesados como acabamos de exponer, se utiliza el simulador HP-HFSS a fin de realizar el

análisis en 3-D de la distribución de los campos electromagnéticos dentro de la sección de guía de ondas WR430 conteniendo muestra de tejido biológico.

Los cortes de cada tejido conservados, como dijimos en su momento, en placas petri a 0-4°C, se introducen en la cavidad rectangular del contenedor de muestra, de manera que la llene en su totalidad. Posteriormente se introduce el contenedor de muestra así preparado en la guía de ondas. A cada muestra de tejido le es aplicado un campo de radiofrecuencia de 2,45 GHz, midiéndose en cada ocasión sus coeficientes de reflexión y transmisión, utilizando a tal fin el analizador de red HP 8720.

Con el simulador HP-HFSS, anteriormente mencionado, se determina el valor de la permitividad dieléctrica compleja de un tejido que produciría los mismos valores de los coeficientes complejos de reflexión y transmisión que han sido determinados experimentalmente.

De esta manera se obtienen analíticamente cuatro parámetros para cada tejido biológico simulado: dos módulos y dos fases. Los valores válidos, como se indicó en su momento, son aquellos que se corresponden con los experimentales en los mismos planos de referencia.

Para cada tejido biológico así analizado se determinan, por tanto, dos datos: la permitividad dieléctrica y la conductividad, propiedades que caracterizan inequívocamente a los diferentes tejidos del organismo. En efecto, las

propiedades eléctricas de los tejidos son las responsables de la interacción de los campos electromagnéticos con las moléculas y estructuras biológicas. La componente eléctrica de dichos campos resulta primordial al encontrarse los tejidos vivos, en condiciones normales, poco magnetizados. De manera que, al incidir un campo electromagnético sobre un organismo, la componente eléctrica induce a escala microscópica dos procesos: la oscilación y desplazamiento de las cargas libres, así como la orientación de moléculas polares a la frecuencia de aplicación del campo.

De esta forma, valores elevados de la permitividad implican un efecto de apantallamiento considerable para el campo eléctrico, mientras que la conductividad (recíproco de la resistividad) da lugar a la circulación de corrientes inducidas en los tejidos.

III.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados experimentales, así como para una correcta comparación entre ellos, se aplica un análisis estadístico a los valores obtenidos en las distintas repeticiones de cada ensayo. Existen multitud de paquetes estadísticos capaces de ofrecer una gran calidad y, sobre todo, rapidez y sencillez de manejo. Con el análisis estadístico el investigador busca conocer la muestra y si se pueden inferir los resultados al total de la población a estudio.

A fin de conocer la muestra se puede trabajar con cada variable por separado o bien asociando variables. Cuando se trata de conocer variables aisladas, se parte de la distribución de frecuencias de dichas variables y se buscan las medidas de tendencia central (media, mediana, moda) y las medidas de variabilidad (desviación media, desviación estándar).

Si se trata de estudiar las relaciones entre dos variables, se trabaja con cuadros descriptivos de doble entrada; se pretende con ellos averiguar si existe o no relación entre ellas y determinar el grado de asociación existente, lo que se determina mediante los coeficientes de correlación.

En cuanto a realizar inferencias, el problema central es averiguar si los datos obtenidos en la muestra son debidos al azar o son realmente representativos de la población. Para solucionar este problema se aplican las pruebas de contraste o hipótesis.

En nuestro estudio los datos son pues normalizados a la media de los valores obtenidos, y expresados como media \pm el error estándar de la media (DE) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por duplicado o cuadruplicado de un número variable de experimentos, especificado en cada caso.

Las diferencias establecidas entre los diferentes grupos de estudio fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial. Se realiza un

MATERIAL Y MÉTODOS

test de comparación múltiple Tukey-Kramer, para determinar la significación de las diferencias que pudieran aparecer entre los distintos grupos analizados.

El nivel de significación estadística se estableció en todos los casos en valores de $p < 0.05$. El programa estadístico empleado para el tratamiento de los valores obtenidos en todas las repeticiones de cada experimento fue el INSTAT.

IV.- RESULTADOS.

Exponemos a continuación los resultados obtenidos en los ensayos realizados, y que se desarrollaron tal y como se detalla en el capítulo precedente, siendo los datos aquí expuestos fruto del tratamiento estadístico de los valores recogidos en las repeticiones de cada experimento que en aquél capítulo se refiere. Las barras de error que aparecen en las figuras corresponden a la desviación estándar (DE) para intervalos de confianza del 95%.

IV.1.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS *IN VITRO* REALIZADOS.

IV.1.1- Resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos en sistemas celulares y su posible sinergismo con plomo y hierro.

IV.1.1.a- Resultados obtenidos en la determinación de proliferación celular mediante el método del MTT.

1º- Sistemas celulares sometidos a campo magnético de 50 Hz, sin tratamiento con metales (Controles)

Primeramente expondremos las gráficas resultantes de los datos obtenidos al someter los cultivos de linfocitos procedentes de sangre periférica humana, sin tratamiento adicional (es decir, los que constituyeron

RESULTADOS

lo que denominamos “controles”) a la acción del campo magnético de 50 Hz, comparando los efectos de dicho campo a distintas intensidades (3,2, 6,4 y 9,6 mT) sobre la proliferación de los sistemas celulares estudiados, tomando como referencia un “blanco” incubado en ausencia de campo magnético.

Los resultados, obtenidos mediante cuantificación espectrofotométrica de la densidad óptica de los cultivos tras la exposición, y normalizados a la media de los valores obtenidos \pm DE, se reflejan en la gráfica de la figura 27.

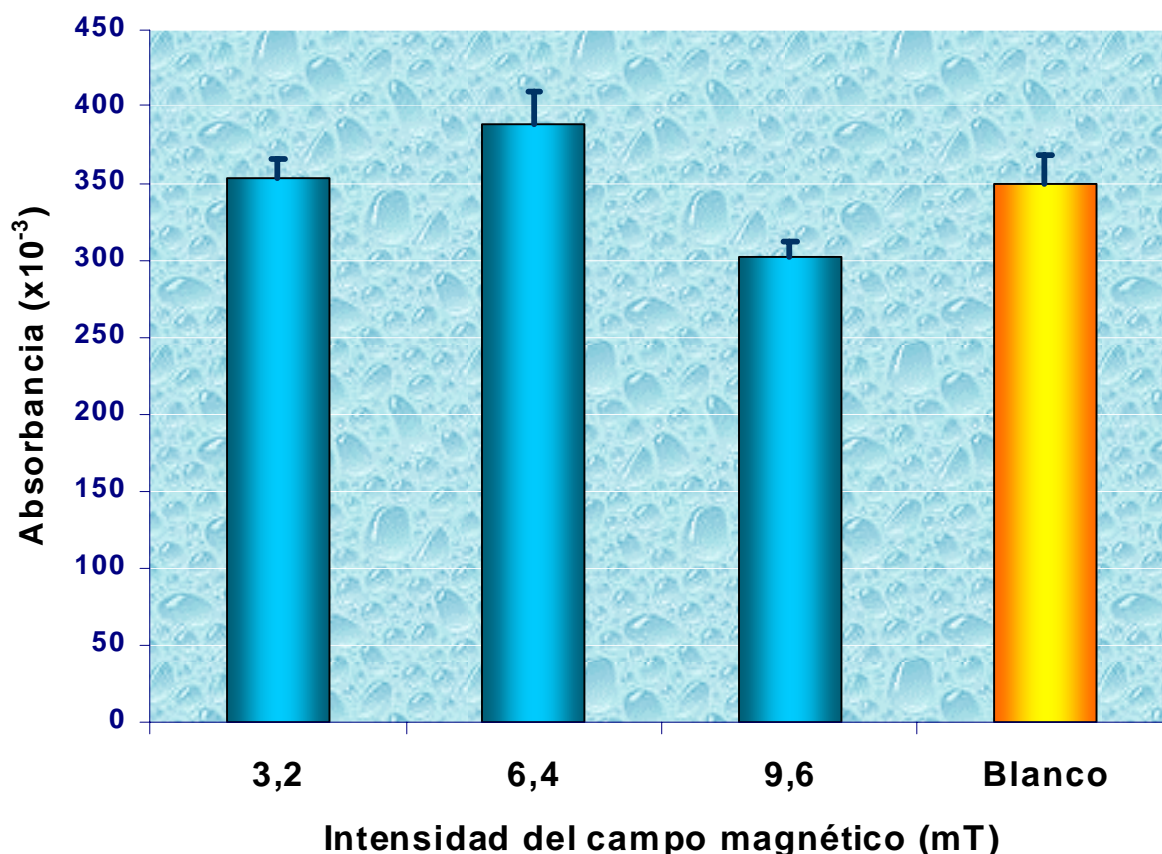


Fig. 27.- Estudio de la proliferación celular de linfocitos en cultivo, sometidos a un campo magnético de 50 Hz a distintas intensidades de campo.

Como se puede observar en la gráfica anterior, no se aprecian diferencias significativas entre el cultivo de linfocitos en ausencia de campo magnético y el expuesto a su acción con una intensidad de campo de 3,2 mT. Existe, en cambio, un aumento de la proliferación celular en el caso de los cultivos incubados en presencia de un campo de intensidad 6,4 mT, aunque esta tendencia presenta una $p > 0,05$ al ser comparada con el blanco.

En el momento de presentar el tratamiento estadístico aplicado a los valores obtenidos ya se expuso que el nivel de significación estadística se definió como $p < 0,05$, lo que determina que entre la proliferación de los cultivos expuestos a la acción de un campo magnético de 6,4 mT de intensidad y el blanco, no existe tampoco una diferencia estadísticamente significativa.

Por otra parte, al comparar los cultivos “blanco” y los cultivos sometidos a la acción de un campo magnético de 9,6 mT, se observa una disminución de la proliferación celular en estos últimos, con $p < 0,05$, lo que, como ya se ha indicado, significa que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio.

2º.- Sistemas celulares sometidos a la acción de un campo magnético de 50 Hz y distintas intensidades e incubados en presencia de hierro

- **Proliferación de linfocitos incubados con diferentes dosis de hierro en presencia de un campo magnético de 50 Hz y 3,2 mT:**

Los resultados obtenidos en el estudio de la proliferación celular en cultivos de linfocitos de sangre periférica sometidos a la acción de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 3,2 mT, e incubados con distintas concentraciones del compuesto de hierro FeSO_4 (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M), tal y como se indicó en el capítulo anterior, vienen reflejados en la gráfica de la figura 28.

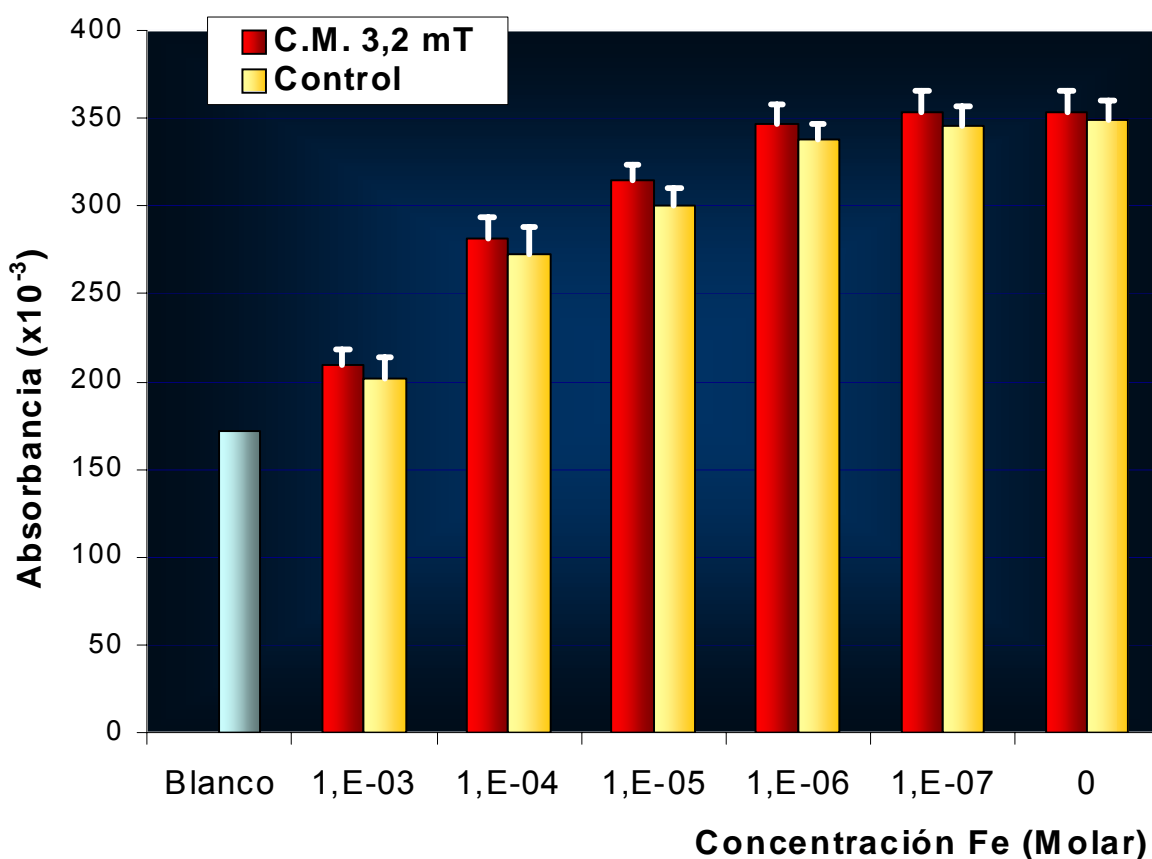


Fig. 28.- Estudio de la proliferación celular, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 3,2 mT, en cultivos de linfocitos incubados 96 h con distintas dosis de Fe.

La gráfica representa, agrupados de dos en dos, los resultados obtenidos al medir la proliferación celular de los linfocitos en presencia y ausencia de campo magnético, con cada concentración de hierro aplicada al cultivo. En esta ocasión, se considera grupos “control” a los cultivos que no han sido incubados con metal, esto es, a los dos histogramas que aparecen bajo la concentración de Fe (Molar) cero, siendo lo que denominamos “blanco” un control negativo consistente únicamente en medio de cultivo al que se han añadido las mismas cantidades de reactivos que a los cultivos celulares, según señala el método del MTT y como ya se indicó en la exposición del capítulo anterior.

Como se puede observar, y así lo corrobora el análisis estadístico, no hay diferencias significativas entre los controles y los cultivos sometidos a CM, como era de esperar y se mostró en la figura 27, siendo $p > 0,05$ en todos los casos.

No ocurre lo mismo al comparar entre sí los valores obtenidos al incubar los linfocitos con distintas dosis del compuesto de hierro, apareciendo diferencias estadísticamente significativas entre la proliferación del cultivo “control” (sin tratamiento con metal) y los grupos tratados con dosis de Fe a las concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M, con $p < 0,05$.

- **Proliferación de linfocitos incubados con diferentes dosis de hierro en presencia de un campo magnético de 50 Hz y 6,4 mT:**

Al igual que en el caso anterior, se estudia el crecimiento de linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo con diferentes dosis del compuesto de hierro caracterizado en el epígrafe III.2 del capítulo anterior, la mitad de ellos sometidos al campo magnético de 50 Hz generado por nuestra cámara, pero esta vez con una intensidad de campo de 6,4 mT, y la otra mitad fuera de la cámara, constituyendo los grupos control dentro de cada dosis del metal; los resultados del estudio vienen reflejados en la gráfica de la figura 29.

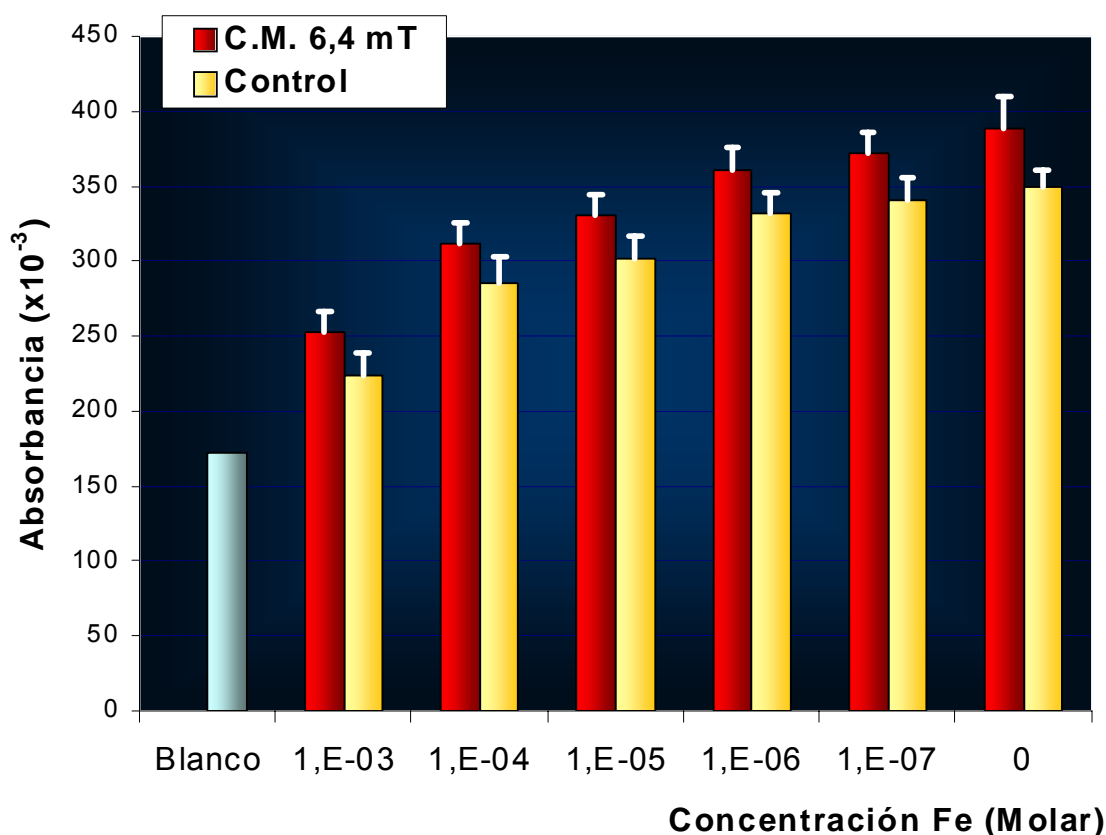


Fig. 29.- Estudio de la proliferación celular, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 6,4 mT, en cultivos de linfocitos incubados 96 h con distintas dosis de Fe.

De nuevo señalamos que, en esta gráfica, lo que denominamos “blanco” no es sino un control negativo (con medio y MTT).

El análisis estadístico de los valores obtenidos ratifica lo esperado según el estudio previo reflejado en la gráfica de la figura 27, no apareciendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y los cultivos sometidos al campo magnético cultivados con las mismas dosis de hierro. Por el contrario, y como también era previsible, encontramos diferencias en el crecimiento de los linfocitos dependiendo de la cantidad de metal con la que han sido tratados, resultando $p < 0,05$ en los casos en los que se contrastan los datos obtenidos para la proliferación de los grupos control (incubados en ausencia de hierro) y los tratados con concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} molar del metal. Al igual que en el caso anterior, la aparente disminución en la proliferación celular a dosis menores de hierro no es estadísticamente significativa.

- **Proliferación de linfocitos incubados con diferentes dosis de hierro en presencia de un campo magnético de 50 Hz y 9,6 mT:**

Los resultados de este experimento provienen, igual que en los dos anteriores, de la incubación de los linfocitos con un barrido de dosis de hierro en presencia y ausencia de campo magnético, esta vez con una intensidad de campo de 9,6 mT, y vienen reflejados en la gráfica de la figura

RESULTADOS

30. Al igual que en las dos gráficas precedentes, los controles los constituyen los cultivos incubados en ausencia de hierro, mientras que el blanco es el control negativo.

Tras el oportuno tratamiento estadístico de los valores obtenidos en el experimento, los resultados validan una vez más los de nuestro primer estudio, confirmando las especificaciones técnicas de la cámara generadora de campos magnéticos de baja frecuencia, ya que constatamos de nuevo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y los sometidos a la acción del campo magnético en cuestión en cada tratamiento con el metal, con una $p < 0,05$.

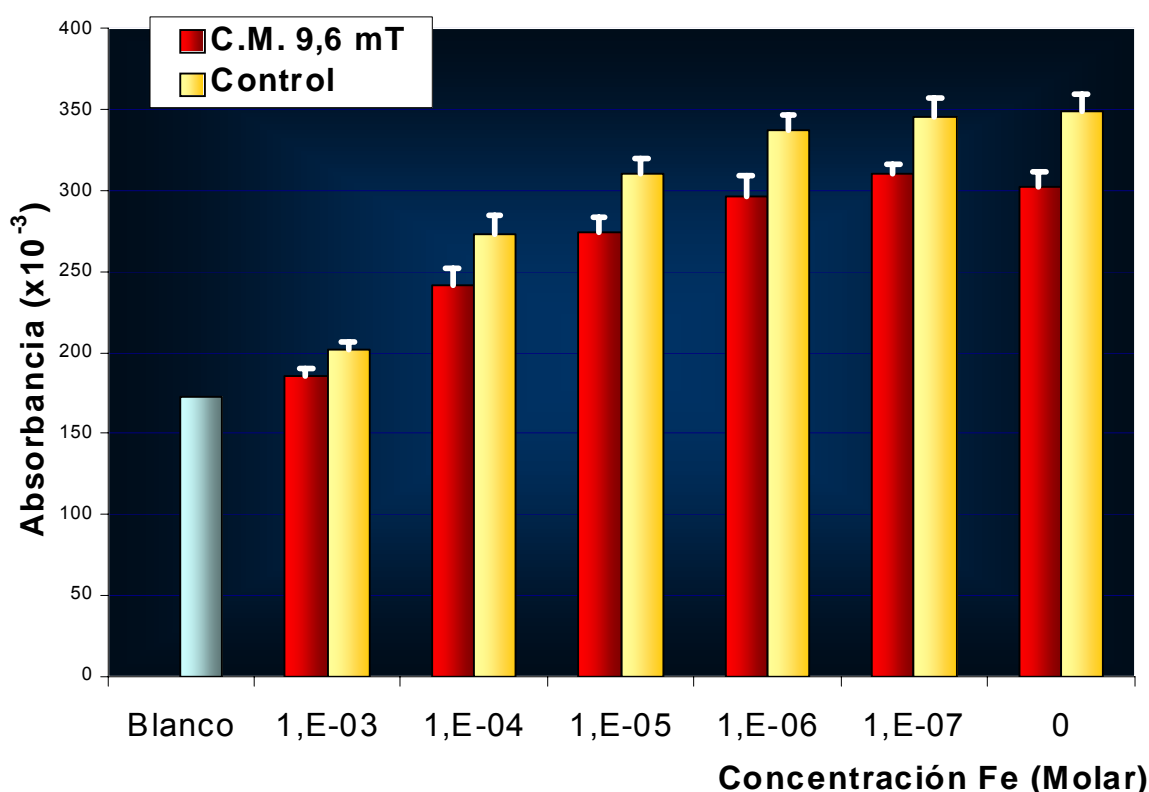


Fig. 30.- Estudio de la proliferación celular, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 9,6 mT, en cultivos de linfocitos incubados 96 h con distintas dosis de Fe.

Además, y al igual que ocurría en los anteriores experimentos, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con altas concentraciones de hierro y los incubados en ausencia del compuesto metálico, con $p < 0,05$ para las concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M.

3º.- Sistemas celulares sometidos a la acción de un campo magnético de 50 Hz y distintas intensidades e incubados en presencia de plomo:

- **Proliferación de linfocitos incubados con diferentes dosis de plomo en presencia de un campo magnético de 50 Hz y 3,2 mT:**

Los resultados expuestos a continuación en la gráfica de la figura 31 son fruto del experimento encaminado a determinar el hipotético sinergismo entre el efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia y el plomo. En esta primera parte la mitad de los cultivos fueron sometidos a la acción del campo magnético de 50 Hz generado por la cámara ya descrita, con una intensidad de campo de 3,2 mT, al mismo tiempo que a los efectos de distintas concentraciones del compuesto de plomo detallado en el epígrafe III.2 del capítulo anterior.

Como en el caso de la exposición de los resultados experimentales llevados a cabo con hierro, en las siguientes gráficas se representan,

RESULTADOS

agrupados de dos en dos, los cultivos incubados con una misma concentración de plomo: en amarillo los grupos control, no sometidos a la acción del campo magnético, y en azul los tratados con él.

Por último, señalar, una vez más, que lo que aparece en la gráfica como “blanco” es la representación del control negativo

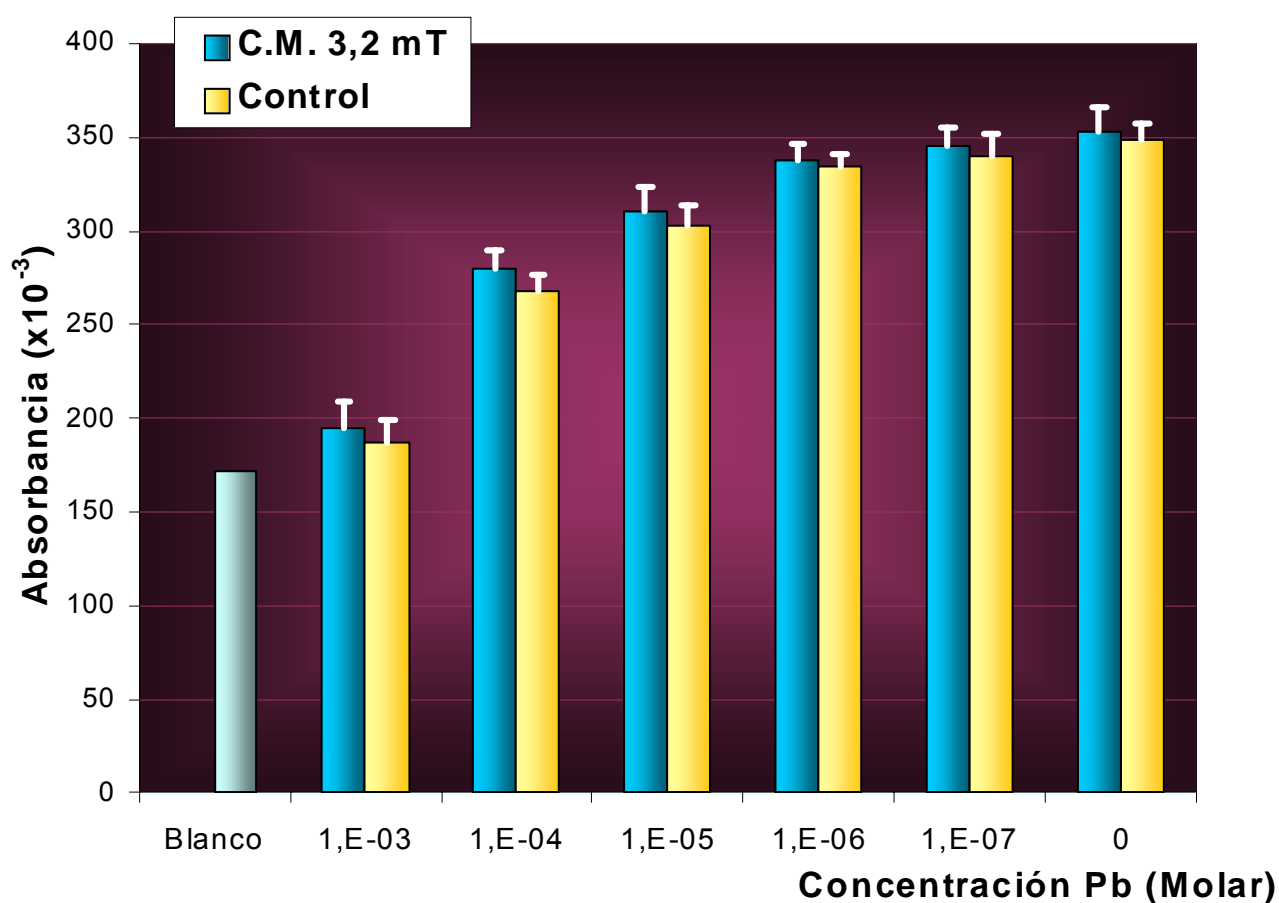


Fig. 31.- Estudio de la proliferación celular, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 3,2 mT en cultivos de linfocitos incubados 96 h con distintas dosis de Pb.

Se reiteran en este caso, al igual que en los anteriores, los resultados obtenidos en los estudios previos respecto a los efectos del campo

magnético de 3,2 mT sobre la proliferación celular, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas en ningún caso entre los cultivos no sometidos a la acción del campo y los que sí lo fueron. En cuanto al tratamiento con el metal, se observan diferencias estadísticamente significativas, con $p < 0,05$, entre los cultivos control, incubados en ausencia del compuesto de plomo, y aquellos a los que se trató con concentraciones elevadas del mismo, concretamente las de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M, observándose una disminución importante en la proliferación celular de dichos cultivos. A concentraciones menores, a pesar de cierta tendencia a la disminución del crecimiento de las poblaciones de linfocitos incubados con ellas, las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas.

- **Proliferación de linfocitos incubados con diferentes dosis de plomo en presencia de un campo magnético de 50 Hz y 6,4 mT:**

Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación se reflejan en la gráfica de la figura 32, donde se puede observar la representación de la proliferación celular de cultivos de linfocitos humanos sometidos a la acción del campo magnético de 50 Hz y, en esta ocasión, a una intensidad de campo de 6,4 mT, comparados con cultivos no sometidos al efecto de dichos campos, y todos ellos incubados con concentraciones crecientes de plomo. Al ser la representación gráfica utilizada para mostrar estos resultados la misma que en el caso anterior, omitimos más explicaciones.

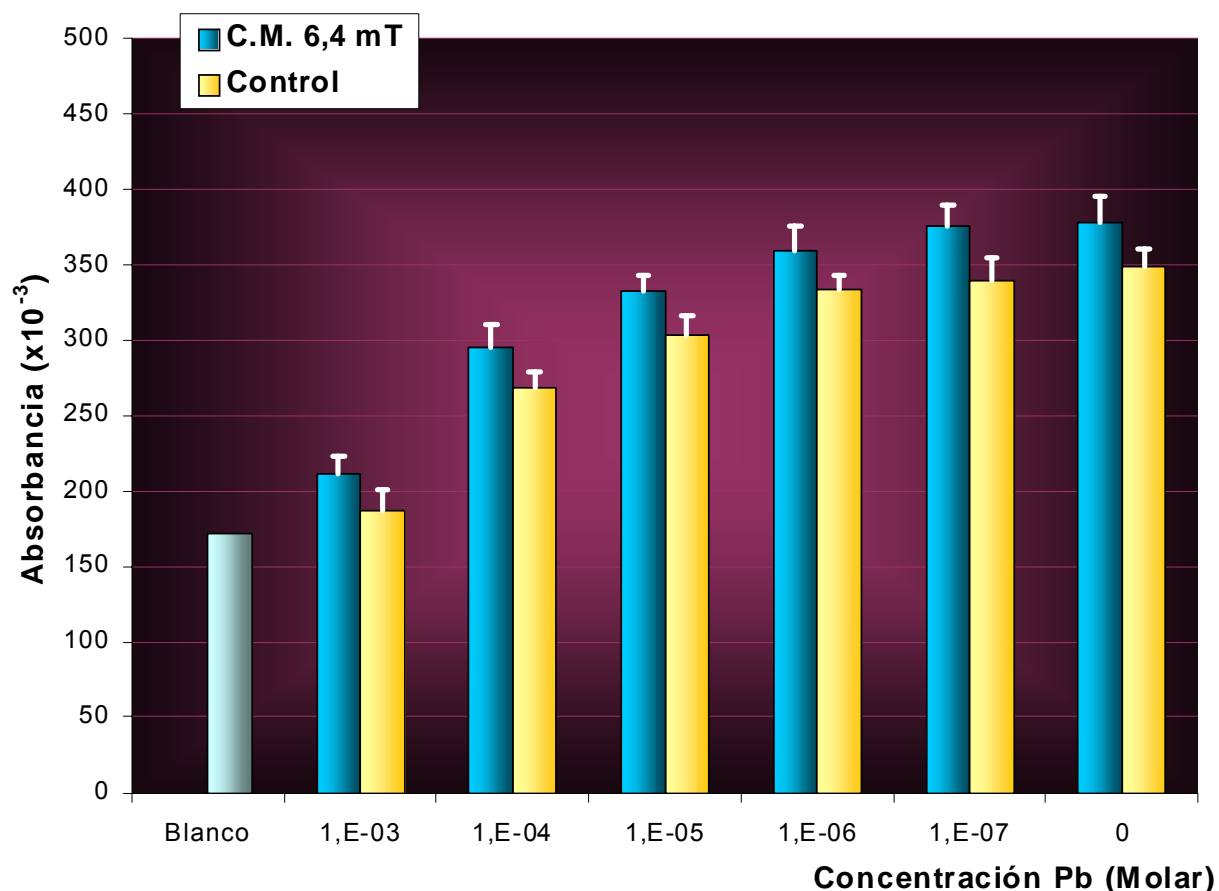


Fig. 32.- Estudio de la proliferación celular, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 6,4 mT, en cultivos de linfocitos incubados 96 h con distintas dosis de Pb.

Aplicando idéntica metodología a la ya descrita se constata, al observar los valores obtenidos en el estudio normalizados a la media \pm DE que, al igual que en los estudios anteriores con esta intensidad de campo, no existen diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de los linfocitos al aplicar a los cultivos el campo magnético señalado, teniendo como referencia cultivos en idénticas condiciones pero no sometidos a la acción de dicho campo.

Por el contrario, aparecen una vez más diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sí las proliferaciones de los cultivos incubados con dosis crecientes de plomo, a las concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M del compuesto metálico, que presentan una $p < 0,05$.

- **Proliferación de linfocitos incubados con diferentes dosis de plomo en presencia de un campo magnético de 50 Hz y 9,6 mT:**

Actuando de la misma manera que en los experimentos previos, los resultados obtenidos al comparar el crecimiento de linfocitos en cultivo sometidos a la acción de un campo magnético de 50 Hz y con intensidad de campo de 9,6 mT, incubados con dosis crecientes de plomo, vienen reflejados en la gráfica de la figura 33.

Tras el oportuno tratamiento estadístico de los valores obtenidos en esta etapa del estudio, se confirma de nuevo la disminución de la proliferación celular en los cultivos sometidos a la acción del campo magnético en relación con los no sometidos, disminución estadísticamente significativa en todos los casos al ser $p < 0,05$.

A la vez se puede comprobar asimismo un menor crecimiento, con significación estadística, en los cultivos incubados con concentraciones de plomo de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M.

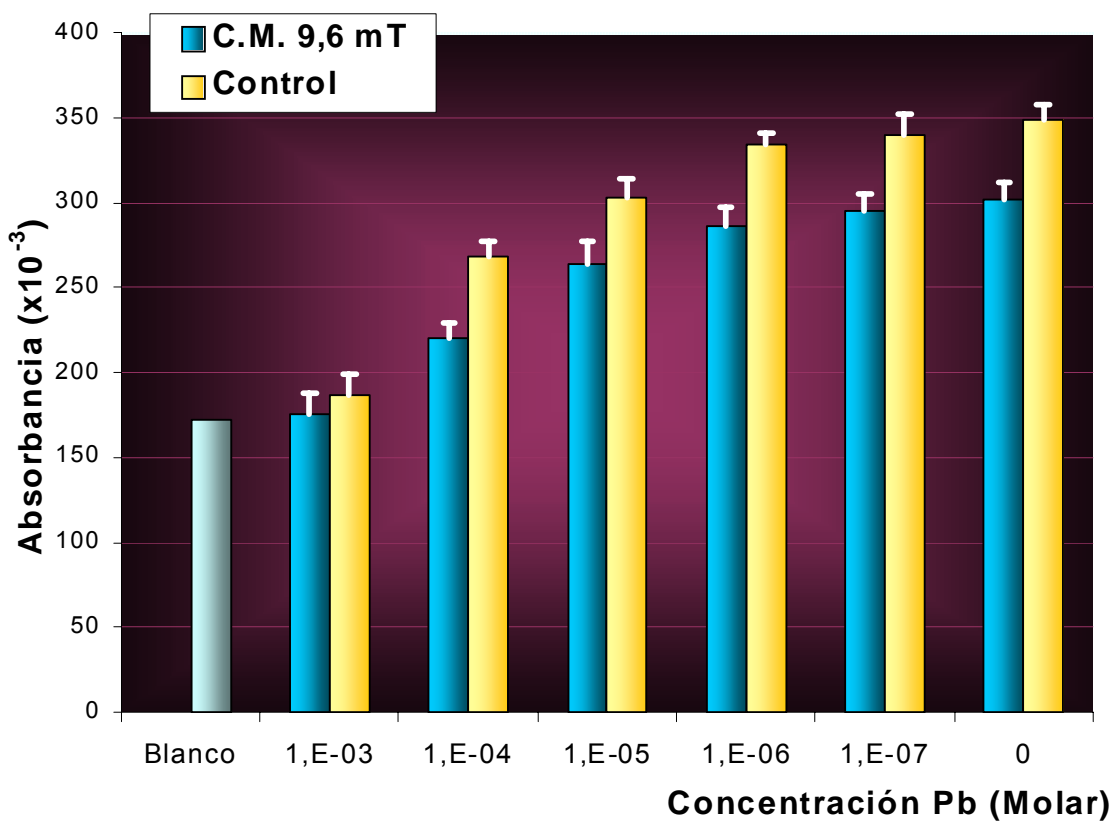


Fig. 33.- Estudio de la proliferación celular, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz e intensidad 1,5 A, en cultivos de linfocitos incubados 96 h con distintas dosis de Pb.

Recapitulación de los resultados expuestos:

En todos los experimentos realizados, los valores obtenidos, tras su tratamiento estadístico, indican que no existen diferencias significativas, en cuanto a la proliferación celular se refiere, entre los cultivos sometidos a la acción de un campo magnético de 50 Hz a las intensidades de 3,2 y 6,4 mT, y los no sometidos a dichos campos, siendo, sin embargo, estadísticamente significativa la disminución del crecimiento celular en el caso de cultivos

sometidos a un campo de 50 Hz e intensidad 9,6 mT, extremo éste que se comentará más adelante.

En lo tocante a los metales, en todos los ensayos, independientemente del campo magnético aplicado, las concentraciones que presentan diferencias estadísticamente significativas con los controles son las de 10^{-3} y 10^{-4} M, en el caso del hierro y las de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M en el del plomo.

IV.1.1.b.- *Resultados obtenidos en el análisis citogenético mediante el ensayo homologado de micronúcleos con bloqueo citogenético (BC)*

Los resultados a continuación expuestos son el corolario de los ensayos llevados a cabo con el fin de determinar daño en el ADN por parte de los campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) y con distintas intensidades de campo (3,2, 6,4 y 9,6 mT), en términos de inducción de micronúcleos, tal y como se explicó en su momento en el parágrafo III.3.d del capítulo precedente.

Asimismo, proporcionamos aquí los resultados del estudio del posible sinergismo de los citados campos magnéticos con distintas dosis de los compuestos de plomo y hierro caracterizados en el apartado III.2 del antedicho capítulo.

RESULTADOS

El conteo de micronúcleos se basa en la observación directa de las células al microscopio, como ya se indicó. La representación esquemática de la estructura de un linfocito típico en estado inactivo, se muestra en la figura 34; los linfocitos T y B, cuando no están activados presentan un gran núcleo simple rodeado por una aureola de citoplasma (en anillo), aparato de Golgi pequeño, gránulos escasos y retículo endoplasmático rugoso poco desarrollado. Además tiene gran número de ribosomas libres.

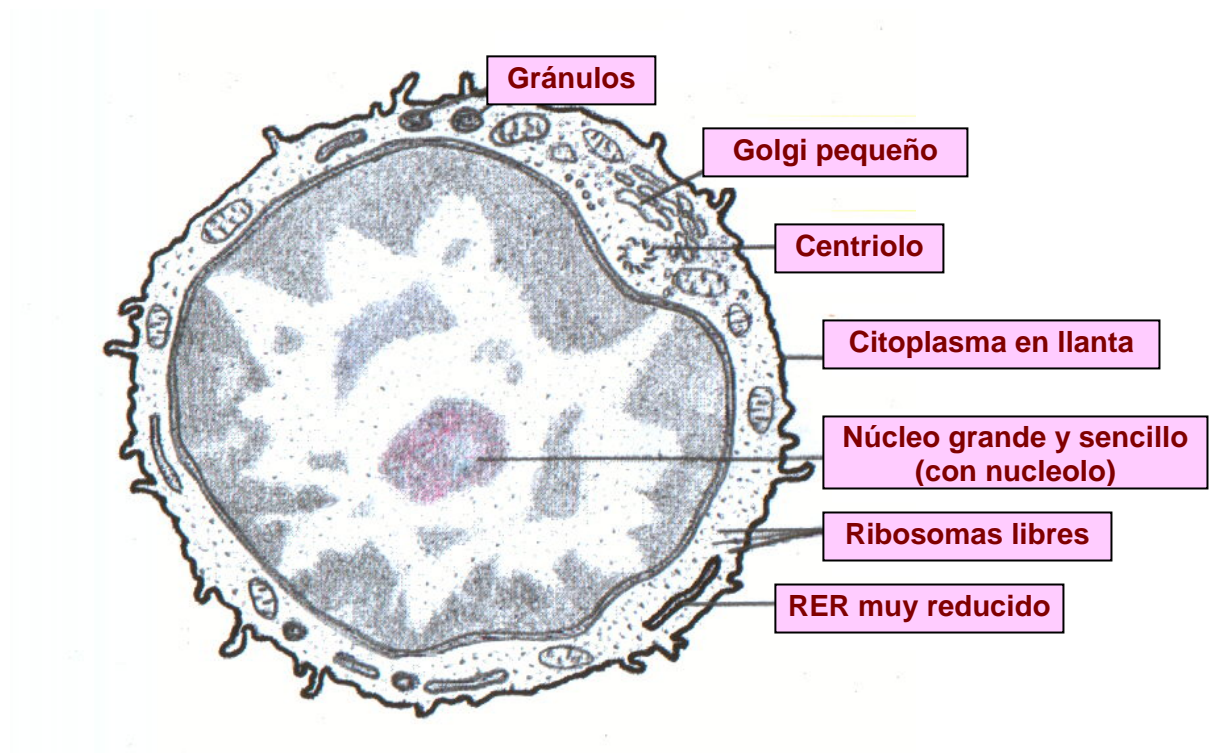


Fig. 34.- Representación esquemática de un linfocito con sus orgánulos característicos.

El cultivo de linfocitos control, fijado y teñido según la técnica expuesta en el anteriormente citado epígrafe II.3.d, en el que las células presentan la morfología que allí se describía y que acabamos de ver esquemáticamente

RESULTADOS

representada en la figura anterior (un citoplasma de color azul claro y un núcleo, que ocupa casi todo el citoplasma, de color violeta), viene reflejado en la imagen de la figura 35 que a continuación se aprecia.

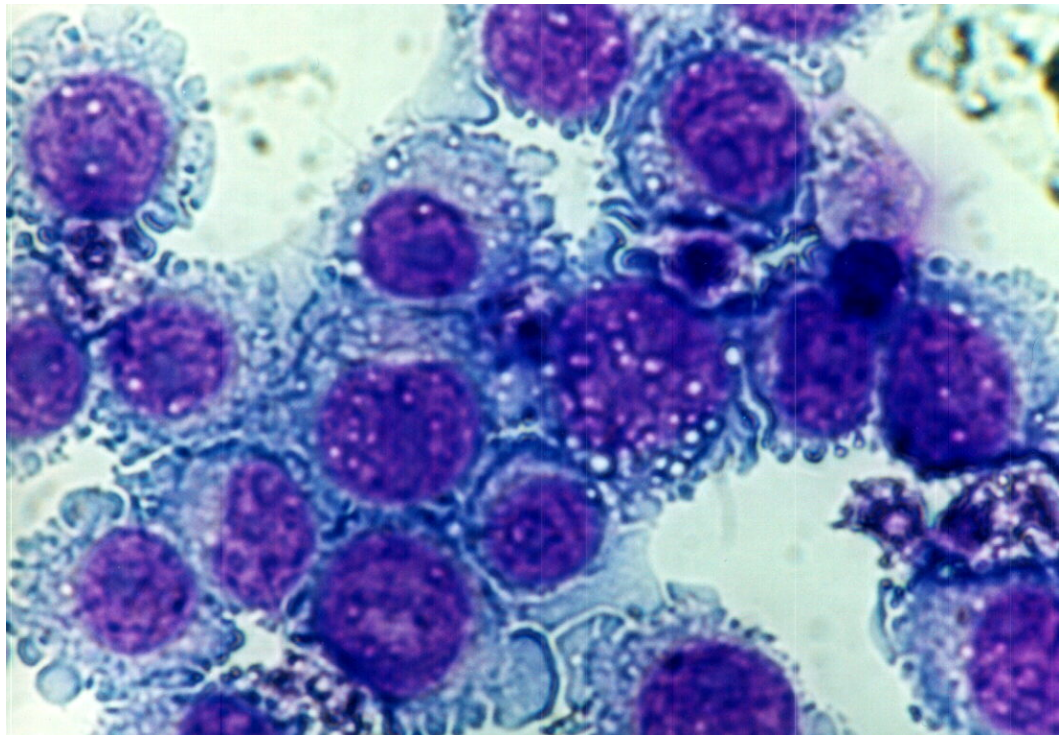


Fig. 35.- Imagen de un cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica sin tratamiento alguno y teñidas con el método de tinción rápida de Grifols (modificación del método de Wright- Giemsa).

En las figuras siguientes se muestran, respectivamente, las imágenes de una célula binucleada (figura 36) y de una célula binucleada con un micronúcleo (figura 37), obtenidas mediante fotografía microscópica de las observadas en nuestros cultivos control, sin tratamiento con campo

RESULTADOS

magnético ni con metales, tan sólo con el bloqueo citogenético provocado por la adición, en el medio de cultivo, de citocalasina-B, con el aspecto que presentan una vez fijadas y teñidas como en su momento se especificó.



Fig. 36.- Imagen del aspecto de un linfocito humano de sangre periférica binucleado con BC mediante citocalasina-B, tras tinción rápida de Grifols (modificación del método de Wright- Giemsa).

La frecuencia espontánea de micronúcleos, a modo de control negativo, se evaluó, al igual que el resto de los ensayos, de sangre periférica humana. Dicha frecuencia oscila entre 0 y 7 micronúcleos por cada 500

RESULTADOS

células binucleadas observadas, siendo la media de micronúcleos \pm DE igual a $3,08 \pm 0,69$.



Fig. 37.- Imagen del aspecto de un linfocito humano de sangre periférica binucleado con BC mediante citocalasina-B, mostrando un micronúcleo, tras tinción rápida de Grifols (modificación del método de Wright- Giemsa).

Aplicando la metodología estadística descrita en el capítulo III, concretamente en el epígrafe III.5, los valores resultantes de las distintas repeticiones de cada experimento, fueron normalizados a la media \pm DE, reflejándose los resultados de dicho tratamiento estadístico en las tablas 12 y 13 que a continuación se exponen.

RESULTADOS

Dado que la supervivencia de las células a la concentración de 10^{-3} M de los compuestos metálicos citados era escasa (prácticamente igual al blanco sin células) no resultó factible el recuento de 500 células binucleadas en las preparaciones de los cultivos incubados en las condiciones aludidas, por lo que no se ofrecen resultados, en términos de micronúcleos, de dicho tratamiento.

Asimismo no se reflejan en la tabla los resultados obtenidos a partir de los cultivos incubados con la concentración 10^{-7} M de los compuestos de plomo y hierro apuntados, al ser éstos prácticamente coincidentes con los resultados del cultivo control.

- Micronúcleos en los cultivos incubados con plomo:**

INTENSIDAD DE CAMPO	MEDIA DE MICRONÚCLEOS/ 500 CÉL. BINUCLEADAS \pm DE			
	MN Control	MN Pb 10^{-4} M	MN Pb 10^{-5} M	MN Pb 10^{-6} M
Sin CM	3,08 \pm 0,69	10,21 \pm 1,73	6,87 \pm 0,32	4,97 \pm 2,21
3,2 mT	3,46 \pm 0,52	11,42 \pm 2,82	7,25 \pm 0,86	5,28 \pm 1,52
6,4 mT	4,00 \pm 1,15	11,97 \pm 1,63	7,73 \pm 1,41	5,71 \pm 0,96
9,6 mT	4,64 \pm 0,88	12,50 \pm 0,95	8,00 \pm 2,25	6,10 \pm 1,27

Tabla 12.- Contaje de micronúcleos en 500 células binucleadas observadas a distintas intensidades de campo magnético de 50Hz, y con dosis decrecientes de plomo, tras 96 h de incubación.

RESULTADOS

Tras la evaluación de las diferencias establecidas entre los diferentes grupos de estudio mediante el análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y el test de comparación múltiple Tukey-Kramer, es posible establecer que entre el control y las concentraciones de plomo de 10^{-4} y 10^{-5} M, existen diferencias estadísticamente significativas, al resultar $p < 0,05$, valor en el que, como ya se señaló, se estableció la significación estadística. Por el contrario, no existen diferencias a considerar entre los grupos sometidos a distintas intensidades de campo, independientemente del tratamiento adicional a ellos aplicado.

- **Micronúcleos en los cultivos incubados con hierro:**

INTENSIDAD DE CAMPO	MEDIA DE MICRONÚCLEOS/ 500 CÉL. BINUCLEADAS \pm DE			
	MN Control	MN Fe 10^{-4} M	MN Fe 10^{-5} M	MN Fe 10^{-6} M
Sin CM	3,08 \pm 0,69	11,35 \pm 1,52	5,94 \pm 1,22	4,52 \pm 1,01
3,2 mT	3,46 \pm 0,52	10,51 \pm 0,82	6,43 \pm 0,86	5,28 \pm 0,21
6,4 mT	4,00 \pm 1,15	10,84 \pm 0,73	7,07 \pm 0,39	4,71 \pm 0,76
9,6 mT	4,64 \pm 0,88	11,00 \pm 1,26	6,85 \pm 0,46	5,10 \pm 1,12

Tabla 13.- Contaje de micronúcleos en 500 células binucleadas observadas a distintas intensidades de campo magnético de 50Hz, y con dosis decrecientes de hierro, tras 96 h de incubación.

Al igual que en el ensayo anterior, en el caso del hierro, y empleando idéntica metodología, se llegó a establecer una diferencia estadísticamente significativa únicamente entre el control y las concentraciones de hierro de 10^{-4} y 10^{-5} M, con $p < 0,05$, a pesar de una tendencia al aumento de micronúcleos pareja al aumento de intensidad de campo, pero que no resultó estadísticamente significativa en ninguno de los casos analizados.

IV.1.2.- Resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos sobre tejido sanguíneo humano

En esta segunda parte de la exposición de resultados obtenidos en nuestros estudios *in vitro*, se exponen aquellos reunidos a partir de los ensayos realizados con sangre humana a fin de determinar los posibles efectos que sobre ésta pudieran tener los campos electromagnéticos de baja frecuencia, en concreto los generados por la cámara descrita de 50 Hz, a distintas intensidades de campo (1,6, 3,2 y 6,4 mT), según se refiere en el epígrafe III.3.2 del capítulo precedente, llevando para ello a cabo una analítica rutinaria del suero sanguíneo.

IV.1.2.a.-Resultados de la determinación de parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo

Los resultados aquí expuestos corresponden a los ensayos realizados como se acaba de precisar. Los parámetros estudiados en el suero sanguíneo, obtenido de la forma que en el citado capítulo anterior se

RESULTADOS

especificaba son, como ya mencionamos en ese mismo apartado, parámetros bioquímicos (albúmina, bilirrubina total, calcio sérico, fósforo, glucosa, hierro sérico, magnesio, urea y proteínas totales) y enzimáticos (LDH, fosfatasa alcalina, CPK, GOT, GPT y gamma-GT).

Toda vez que tras llevarse a cabo las cuantificaciones no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de los elementos analizados, tan solo se exponen aquí las gráficas, resultantes del tratamiento estadístico de los valores obtenidos, de determinados parámetros que, al menos en apariencia, parecían presentar una tendencia a la variación, bien sea en relación a la dosis de radiación recibida, bien al tiempo transcurrido entre una y otra medida realizada. Dichos elementos son el fósforo y la LDH.

Asimismo se ofrece la gráfica de las proteínas totales, que no presenta en ningún caso variaciones significativas, a modo de control, ya que ello demuestra que cualquier desviación de estos valores que pudiera aparecer en la concentración de enzimas no sería imputable a su desnaturalización o destrucción debida a los distintos tiempos de incubación.

A continuación pasaremos a describir lo antedicho en detalle, no sin antes volver a señalar que los resultados que aquí se reflejan corresponden a la oportuna normalización a la media de los valores obtenidos en las repeticiones de cada ensayo \pm DE, habiendo sido las diferencias establecidas

entre los distintos grupos de estudio evaluadas mediante un análisis de varianza unifactorial con test de comparación múltiple Tukey- Kramer.

1. Resultados obtenidos tras exposición de tejido sanguíneo humano a la acción de un campo magnético de 50 Hz, con una intensidad de campo de 1,6 mT, a distintos tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 horas)

- **Cuantificación de las proteínas totales (g/100mL) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

Como ya adelantábamos, examinando la gráfica obtenida tras el tratamiento estadístico de los valores según el método expuesto, y que se muestra en la figura 38, resulta evidente a simple vista que no se producen cambios significativos en la concentración de proteínas totales en sangre entre los grupos control y los tratados con el campo magnético de 50 Hz a la intensidad de campo de 1,6 mT, a ninguno de los tiempos de incubación.

Asimismo se puede observar que tampoco hay variaciones entre los grupos sin tratar y aquellos en los que la cuantificación se realizó transcurrido un cierto tiempo (6, 12, 24 y 48 horas).

RESULTADOS

No obstante, se realiza el análisis de varianza unifactorial que, como era de esperar, ratifica lo observado con una $p > 0,05$, valor en el que se definió la significación estadística, siendo ésta para valores de $p < 0,05$.

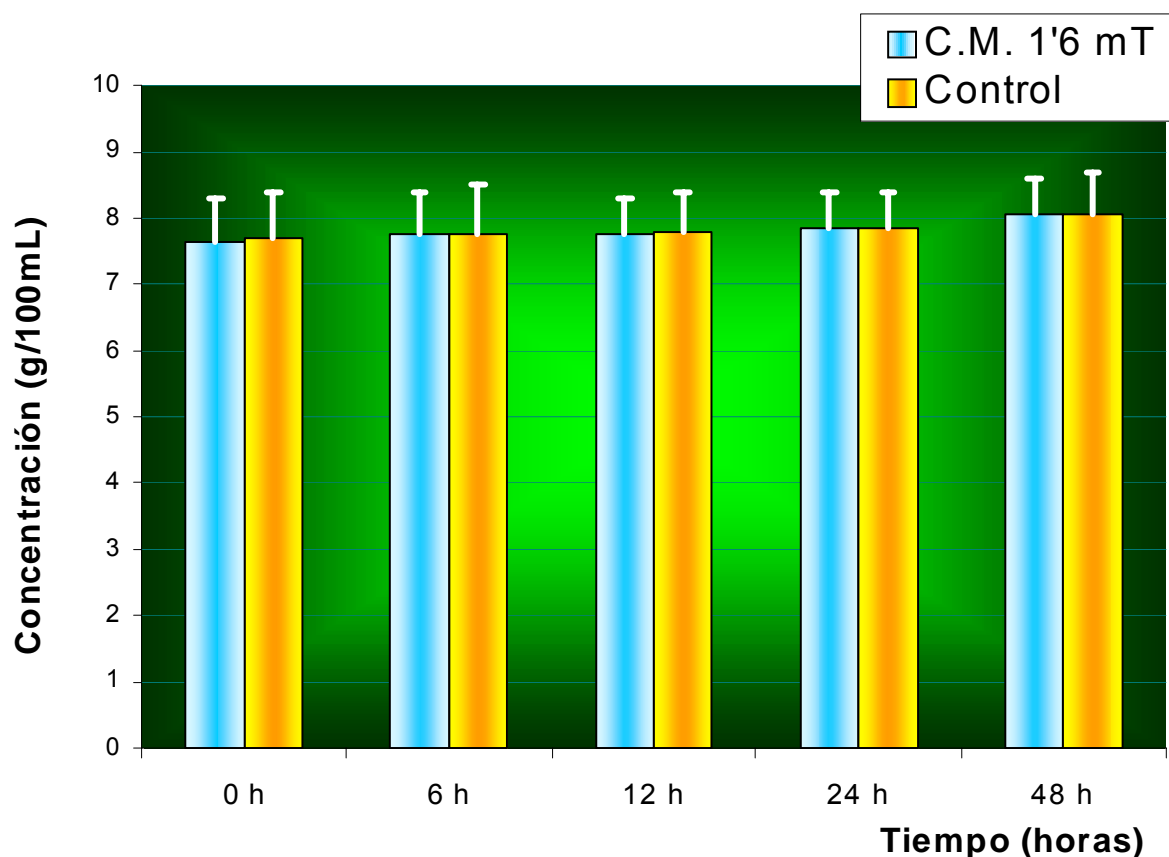


Fig. 38.- Estudio de la concentración de proteínas séricas totales tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 1,6 mT de intensidad.

- **Cuantificación de la concentración de fósforo (mg/100mL) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

Del tratamiento estadístico de los valores obtenidos en las diferentes repeticiones del experimento, reflejados en la gráfica de la figura 39, se

RESULTADOS

concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control (sin exposición a campo magnético) y los tratados con las radiaciones a estudio, en ninguno de los casos analizados.

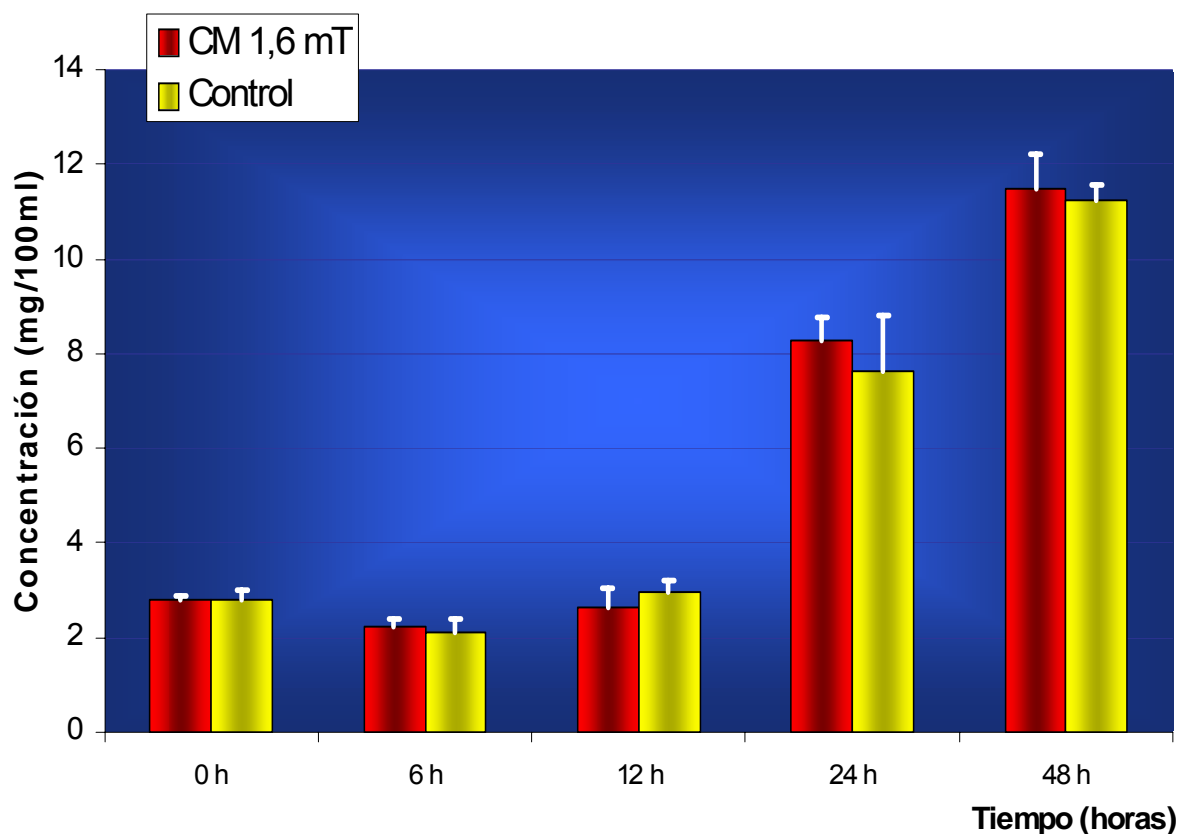


Fig. 39.- Estudio de la concentración de fósforo en suero, tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 1,6 mT de intensidad.

Sin embargo, al comparar entre sí las concentraciones de fósforo tras los diferentes tiempos de incubación, se comprueba que, tanto en los sueros procedentes de la sangre control como en los expuestos al campo magnético, existe un aumento considerable, que resulta estadísticamente

significativo, tras 24 y 48 horas de incubación, con $p < 0.05$, tanto en los grupos control como en los tratados.

- **Cuantificación de la concentración de LDH (U/L) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

En la gráfica de la figura 40 se muestran los resultados obtenidos tras el estudio de las concentraciones de esta enzima una vez sometida la sangre al tratamiento especificado con el campo magnético de muy baja frecuencia.

Procediendo de manera idéntica a la expuesta en los casos anteriores, se concluye que el tratamiento con el campo magnético generado por nuestra cámara a la intensidad de 1,6 mT no produce cambios estadísticamente significativos en los niveles de LDH en sangre a ninguno de los tiempos de exposición estudiados.

Así, a pesar de mostrar los valores obtenidos, una vez normalizados a la media \pm DE los datos de los cinco experimentos realizados, una tendencia al aumento tras las 48 horas de incubación, independientemente del tratamiento con campo magnético, no existen en realidad diferencias estadísticamente significativas, como se comprueba al llevar a cabo el análisis estadístico oportuno.

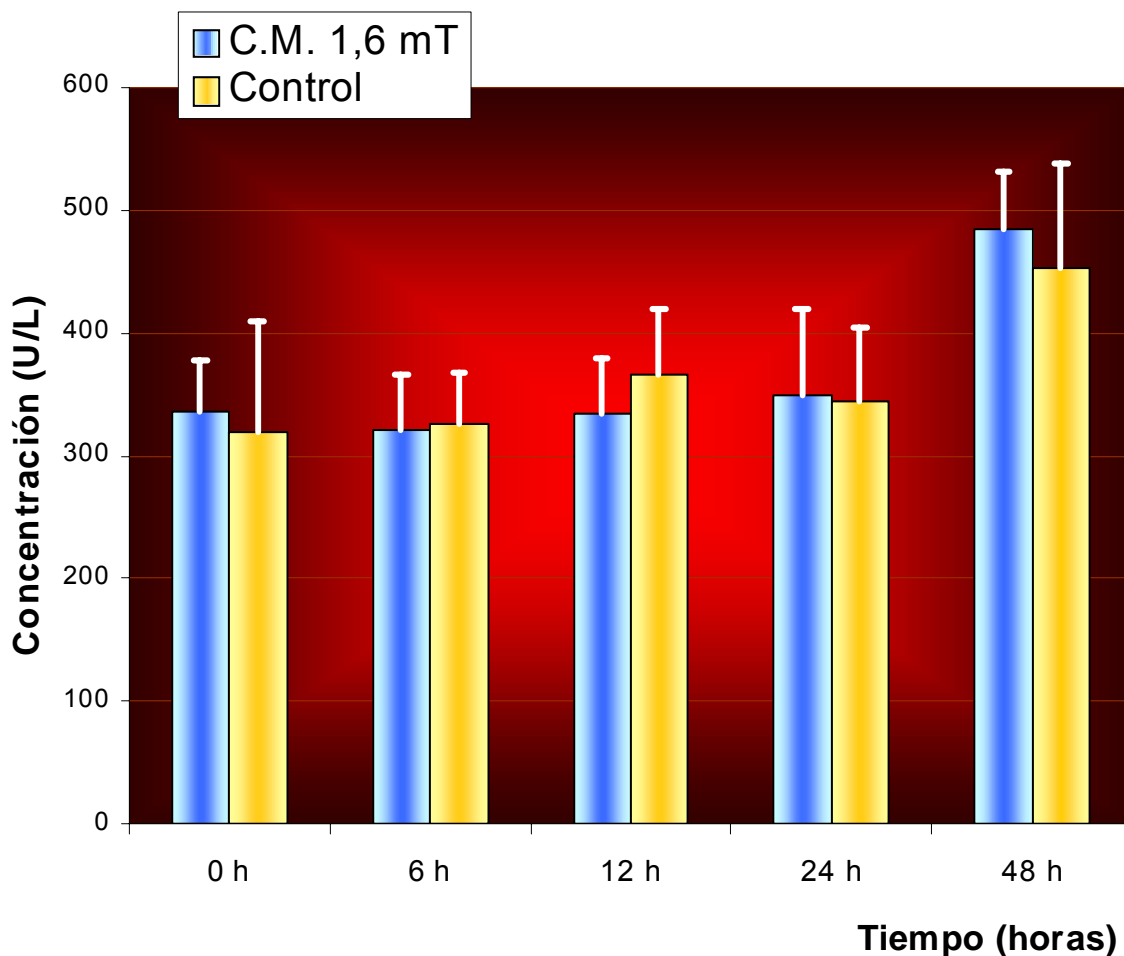


Fig. 40.- Estudio de la concentración de LDH en suero tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 1,6 mT de intensidad.

2. Resultados obtenidos tras exposición de tejido sanguíneo humano a la acción de un campo magnético de 50 Hz, con una intensidad de campo de 3,2 mT, a distintos tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 horas)

Los resultados que a continuación se exponen corresponden a los valores obtenidos en las cinco repeticiones del ensayo consistente en

someter sangre humana al efecto del campo magnético ya citado de 50 Hz, esta vez con una intensidad de campo de 3,2 mT.

Los parámetros cuantificados fueron los mismos ya expuestos en la anterior serie de experimentos y, al igual que en aquellos, las diferencias halladas en las concentraciones de los elementos estudiados no presentaron cambios sustanciales. Este hecho nos impulsa, una vez más, a ofrecer aquí únicamente los resultados de los tres parámetros señalados en el apartado anterior por los mismos motivos allí referidos.

- **Cuantificación de las proteínas totales (g/100mL) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

Como se puede observar en la gráfica correspondiente a los resultados de la cuantificación de proteínas totales en sangre tras el tratamiento con campo magnético, reflejada en la figura 41, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el suero de sangre incubada en ausencia de campo magnético y el de aquella expuesta a su acción con una intensidad de campo de 3,2 mT, tras ser llevado a cabo el tratamiento estadístico oportuno, a ninguno de los tiempos estudiados.

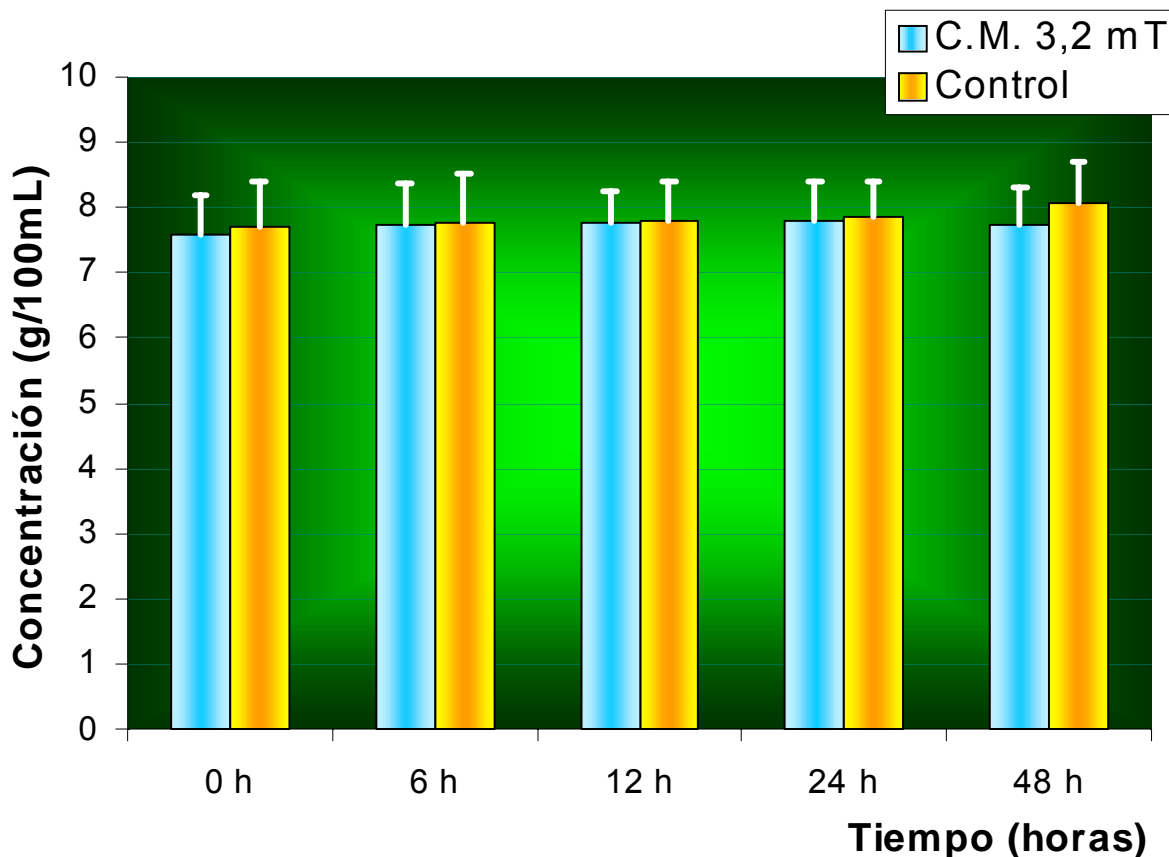


Fig. 41.- Estudio de la concentración de proteínas séricas totales tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 3,2 mT de intensidad.

- **Cuantificación de la concentración de fósforo (mg/100mL) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

Los resultados obtenidos en el estudio de la concentración de este parámetro sanguíneo tras exposición de la sangre al campo magnético apuntado, referido a los valores del mismo elemento en sangre sin tratar, se muestran en la gráfica de la figura 42.

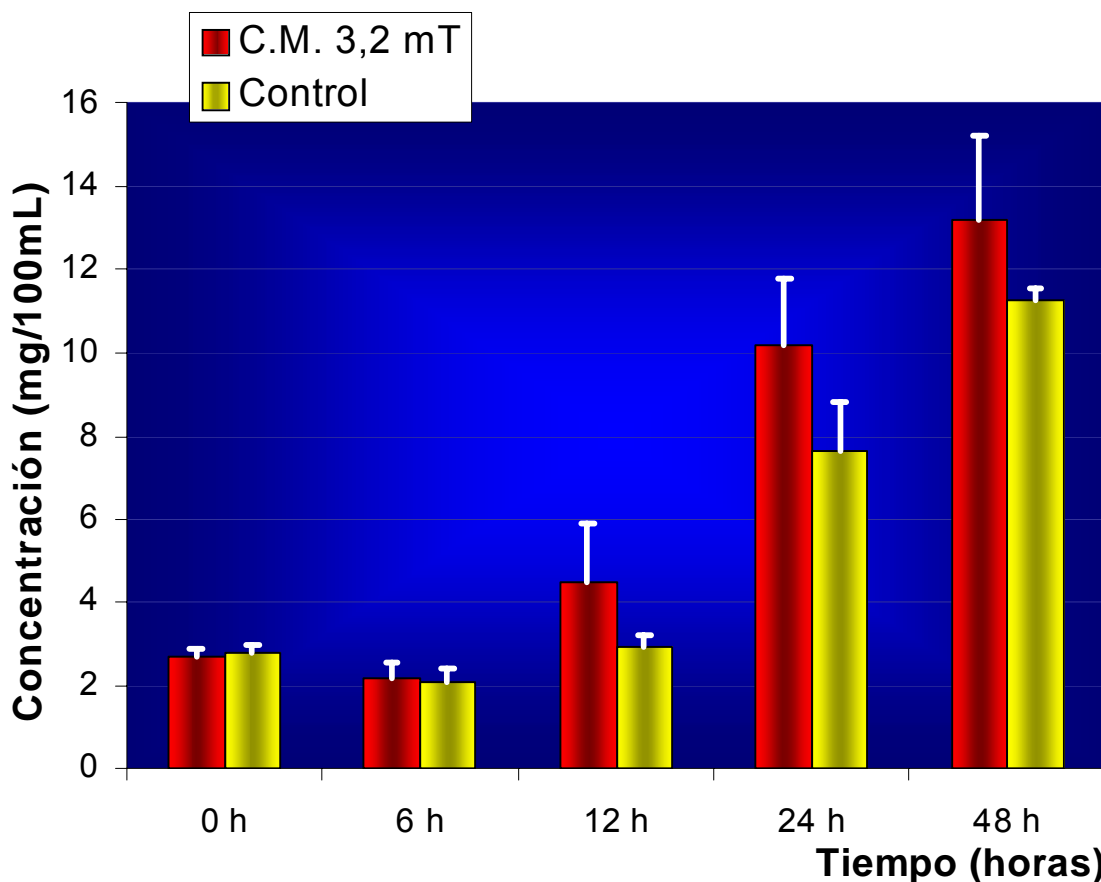


Fig. 42.- Estudio de la concentración de fósforo en suero tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 3,2 mT de intensidad.

Al igual que en el caso de la sangre sometida al campo magnético de intensidad 1,6 mT, las concentraciones de fósforo, en este caso, no registran variaciones tras la exposición de la sangre a los efectos del campo magnético al ser comparadas con los sueros de sangre sin exponer; no obstante, se vuelve a revelar en la gráfica el aumento que sufre la concentración de este parámetro transcurridas 24 y 48 horas de incubación, independientemente del tratamiento con campo magnético.

Una vez aplicado a estos valores el tratamiento estadístico, se confirman estas apreciaciones, resultando no haber cambios estadísticamente significativos entre los grupos control y los expuestos al campo magnético, y presentando, sin embargo, cambios estadísticamente significativos, con $p < 0,05$, los grupos de estudio con periodos de incubación de 24 y 48 horas.

- **Cuantificación de la concentración de LDH (U/L) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

En la figura 43 se representan los resultados obtenidos tras la cuantificación de las concentraciones de esta enzima, tanto en suero de sangre sin tratar como en aquél expuesto a la acción del campo magnético ya aludido, y que dan lugar a la gráfica que sigue.

La citada gráfica revela que, al igual que en la serie de experimentos anteriores con un campo magnético de intensidad 1,6 mT, no aparecen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de sangre expuesta y los control (incubados sin exposición a campo magnético), en lo que se refiere a las concentraciones de LDH.

RESULTADOS

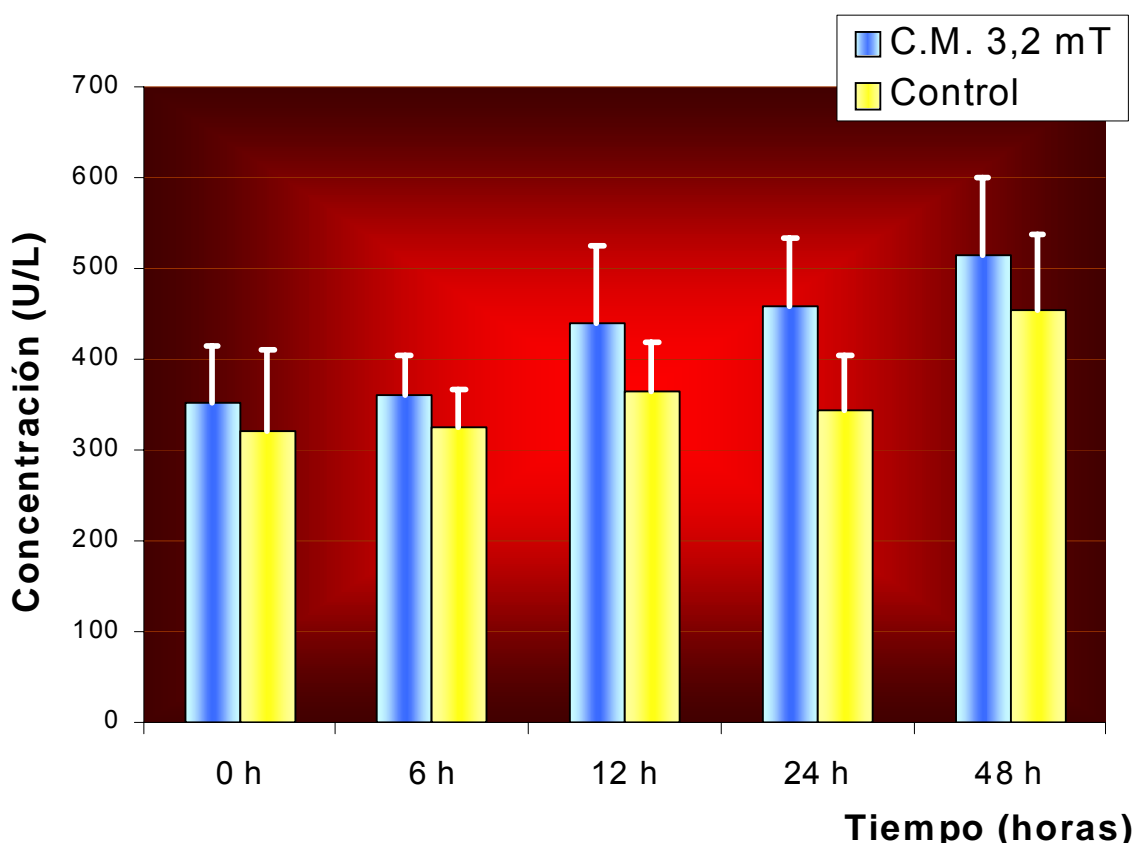


Fig. 43.- Estudio de la concentración de LDH en suero tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 3,2 mT de intensidad.

Este extremo se ve confirmado al realizarse, con los valores obtenidos en las repeticiones del mismo ensayo, el tratamiento estadístico de rigor, no resultando $p < 0,05$ en ningún caso.

3. Resultados obtenidos tras exposición de tejido sanguíneo humano a la acción de un campo magnético de 50 Hz, con una intensidad de campo de 6,4 mT, a distintos tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 horas)

Aplicando idéntica metodología que en los supuestos anteriores, se registran a continuación los resultados obtenidos en la serie de ensayos llevados a cabo con sangre humana expuesta a la acción del campo

magnético de 50 Hz, en esta ocasión aplicando una intensidad de campo de 6,4 mT. Los parámetros representados son los mismos que en los apartados anteriores por los motivos ya señalados.

- **Cuantificación de las proteínas totales (g/100mL) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

Las distintas concentraciones de proteína total en suero de sangre incubada en presencia y ausencia del citado campo magnético, vienen reflejadas en la gráfica de la figura 44.

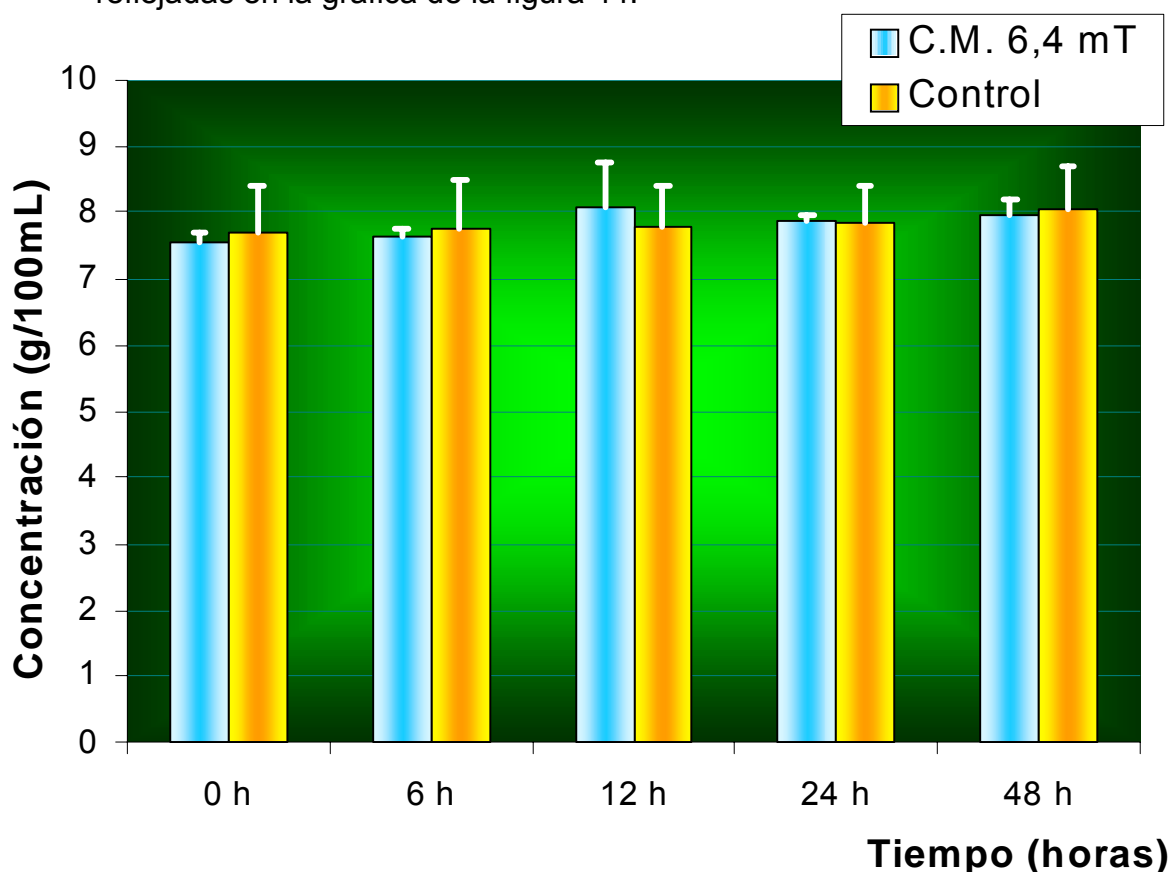


Fig. 44.- Estudio de la concentración de proteínas séricas totales tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 6,4 mT de intensidad.

De nuevo se comprueba, como ya mencionamos al principio de esta parte de la exposición de resultados, que no hay en ningún caso diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y los control, así como tampoco entre los grupos con diferentes tiempos de incubación en cuanto a la concentración de proteínas totales.

- **Cuantificación de la concentración de fósforo (mg/100mL) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

El estudio de las concentraciones de este parámetro en las condiciones apuntadas arroja los resultados reflejados en la gráfica de la figura 45. Como se puede observar en dicha gráfica, las concentraciones de fósforo no presentan variaciones entre sí al comparar los sueros de sangre expuesta a la acción del campo magnético de intensidad 6,4 mT con los control (sin exposición al campo magnético).

Sin embargo, y al igual que comprobamos que ocurría en los casos previamente referidos con intensidades de campo inferiores, se aprecia un aumento importante en las cantidades de este elemento transcurridas 24 y 48 horas de incubación de la sangre estudiada, aumento que resulta independiente de la exposición al campo magnético en cuestión, ya que se da tanto en los grupos expuestos como en los control.

RESULTADOS

Una vez realizado el consabido análisis estadístico, se establece que las diferencias señaladas, entre las concentraciones de fósforo del grupo control y los incubados durante 24 y 48 horas, son estadísticamente significativas, con $p < 0,05$.

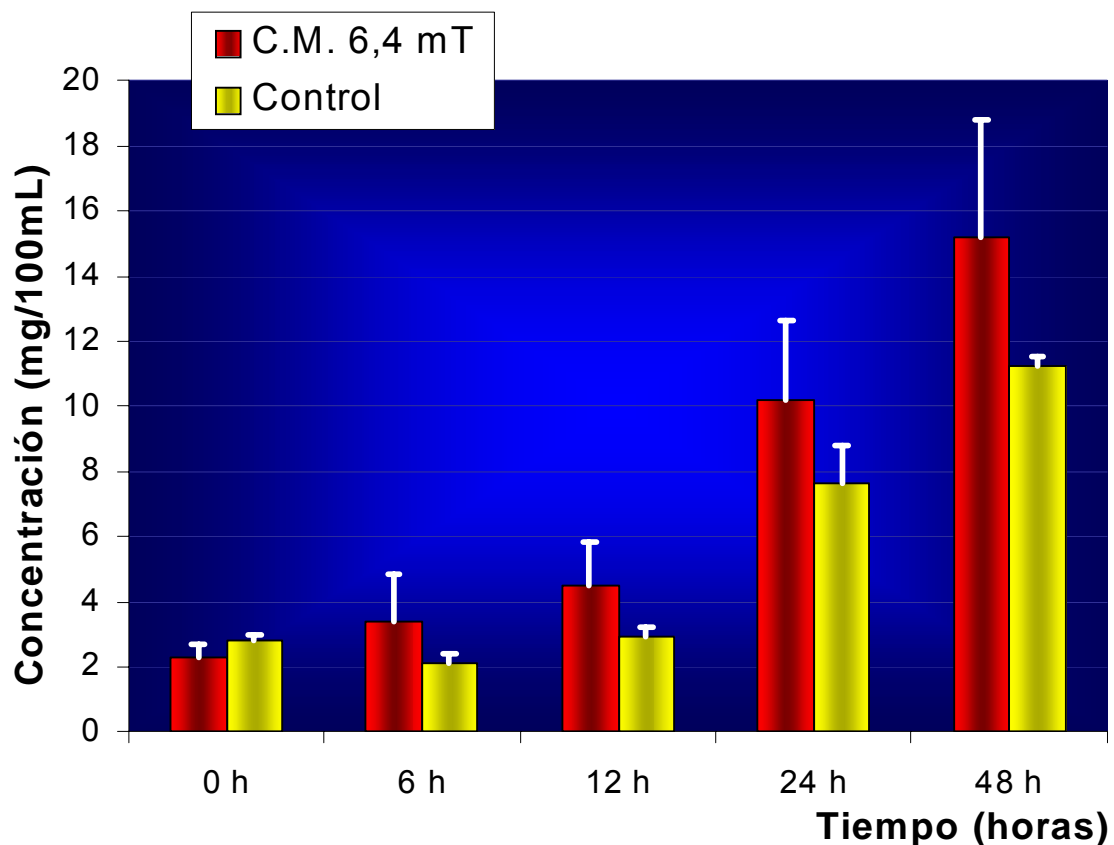


Fig. 45.- Estudio de la concentración de fósforo en suero tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 6,4 mT de intensidad.

- **Cuantificación de la concentración de LDH (U/L) en suero sanguíneo tras la exposición al campo magnético**

Los resultados de las concentraciones de esta enzima en suero sanguíneo de sangre sometida a la acción de un campo magnético de las

RESULTADOS

características señaladas en este epígrafe, comparadas con las concentraciones de la misma sangre sin exponer a dicho campo, se reflejan en la gráfica de la figura 46.

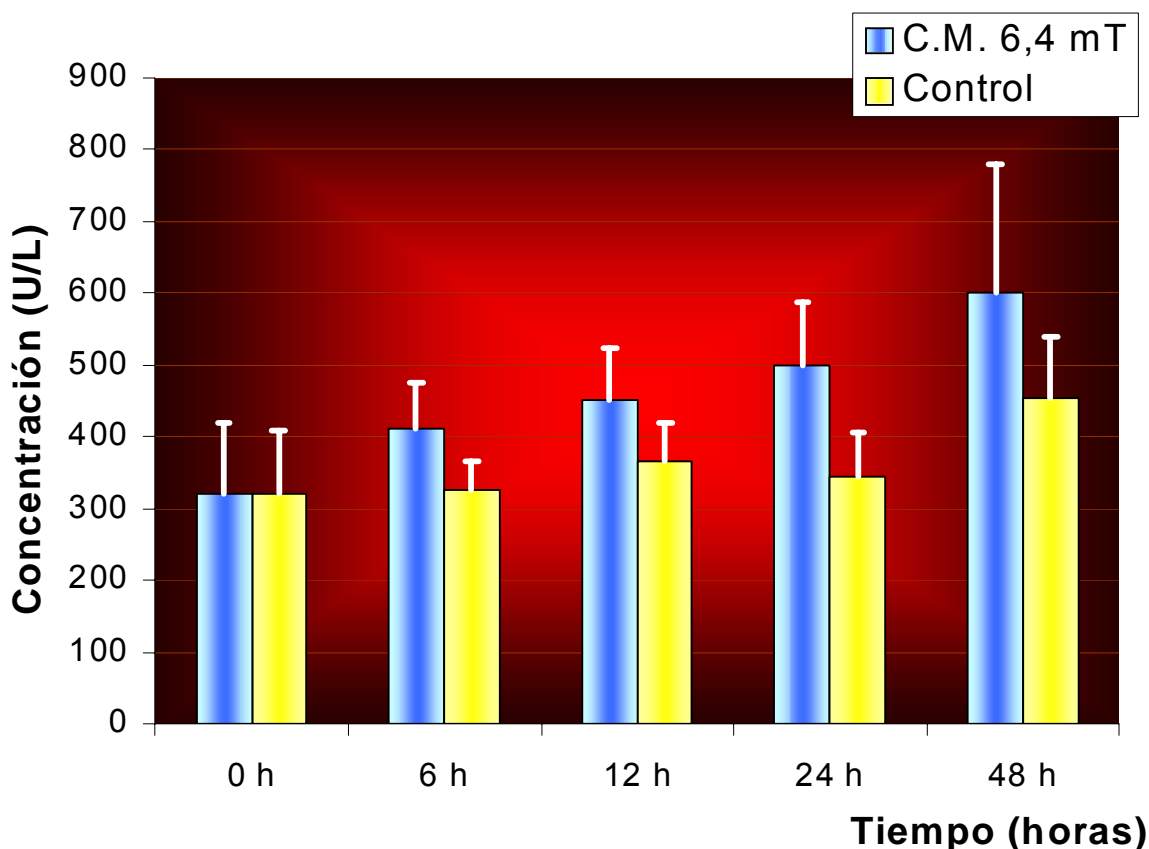


Fig. 46.- Estudio de la concentración de LDH en suero tras distintos tiempos de exposición de sangre humana a un campo magnético de 50 Hz y 6,4 mT de intensidad.

De la representación gráfica de los resultados obtenidos se deduce, de nuevo, que los campos magnéticos utilizados para la exposición de la sangre no influyen en la concentración de la enzima LDH tampoco a la intensidad de 6,4 mT. Tras comparar la mencionada concentración en los grupos expuestos a la acción del campo magnético y los grupos no

expuestos o control, mediante el análisis de varianza ANOVA, se obtiene una $p > 0,05$, lo que se interpreta, tal y como se ha expuesto en repetidas ocasiones, como no significativo estadísticamente.

De igual manera, el análisis estadístico de los datos demuestra que tampoco existen, en este caso, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados a distintos tiempos de exposición.

IV.1.2.b.- *Estudio comparativo de parámetros enzimáticos y bioquímicos de suero sanguíneo en función del campo magnético aplicado*

Una vez realizado el análisis de los valores obtenidos para cada parámetro que parecía presentar variaciones tras la aplicación del campo magnético de 50 Hz a cada una de las intensidades apuntadas (1,6, 3,2 y 6,4 mT) con respecto a los valores control, procederemos a continuación al estudio comparativo de los mencionados parámetros (proteínas totales, fósforo y LDH) medidos a los distintos tiempos de incubación, según la intensidad del campo magnético aplicado.

1. Estudio de la concentración de proteínas totales en suero sanguíneo expuesto a un campo magnético de 50 Hz a distintos tiempos, respecto a las intensidades aplicadas de dicho campo

RESULTADOS

Los valores de las concentraciones de proteínas totales de suero sanguíneo incubado a diferentes tiempos en presencia de un campo magnético de 50 Hz, agrupados según la intensidad de campo aplicada, se muestran en la gráfica de la figura 47.

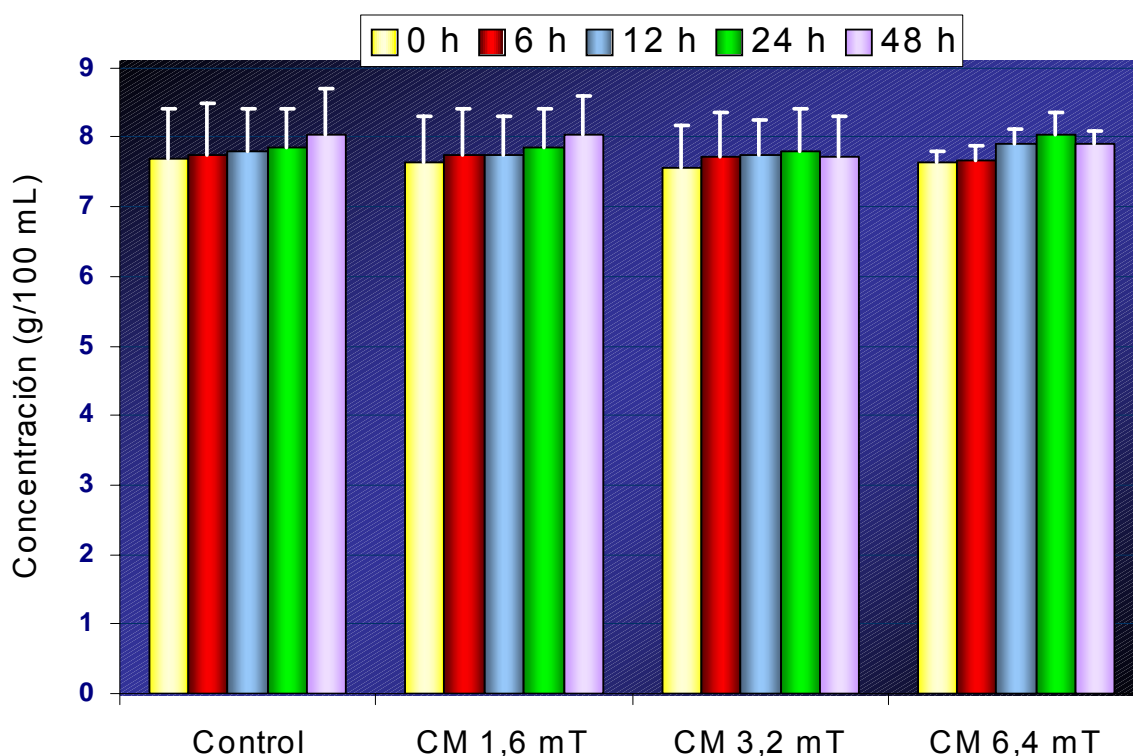


Fig. 47.- Comparativa de las concentraciones de proteínas totales en suero control y expuesto a un CM de 50 Hz a distintos tiempos, según la intensidad de dicho campo (1,6, 3,2 y 6,4 mT).

Como ya apuntamos en las gráficas anteriores concernientes a este parámetro, y una vez realizado el oportuno análisis estadístico de los datos, se ratifica aquí de nuevo la inexistencia de cambios estadísticamente significativos en la concentración de proteínas totales, independientemente de la intensidad de campo aplicada al suero sanguíneo y del tiempo de incubación de éste. La cantidad de proteínas

totales se mantiene, pues, prácticamente constante en la totalidad de las condiciones impuestas por el ensayo .

2. Estudio de la concentración de fósforo en suero sanguíneo expuesto a un campo magnético de 50 Hz a distintos tiempos, respecto a las intensidades aplicadas de dicho campo

En la figura 48 se representan los valores de las concentraciones de fósforo en sueros control y expuestos al campo magnético de 50 Hz a las intensidades de 1,6, 3,2 y 6,4 mT.

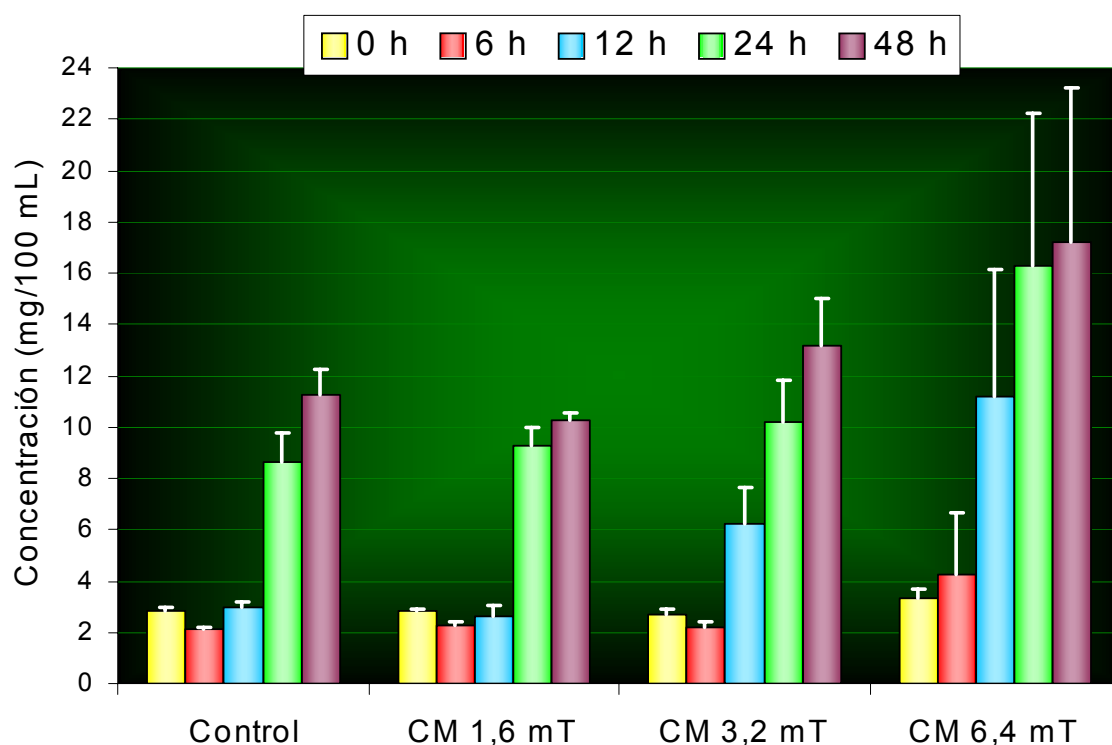


Fig. 48.- Comparativa de las concentraciones de fósforo en suero control y expuesto a un CM de 50 Hz a distintos tiempos, según la intensidad de dicho campo (1,6, 3,2 y 6,4 mT).

Examinando la gráfica obtenida tras el tratamiento estadístico de los valores según el método expuesto en repetidas ocasiones, tanto en el grupo control como en cada uno de los grupos tratados con las diferentes intensidades de campo magnético aplicadas, no se observan variaciones en la concentración de fósforo tras 6 horas de exposición, como ya vimos anteriormente. Asimismo se constata un aumento de dicho parámetro tras 12 h de incubación a las intensidades de 3,2 y 6,4 mT, aunque el incremento no resulta de significación estadística.

Sin embargo, como vimos en su momento, sí se presentan cambios estadísticamente significativos, con $p < 0,05$, a las 24 y 48 horas de incubación con respecto a los sueros control estudiados a las 0 horas de incubación, cambios que se dan en todos los grupos de estudio.

Por otra parte, al cotejar los resultados de los sueros que constituyeron el grupo control con los de los grupos expuestos a las diferentes intensidades de campo magnético, se observa una tendencia al incremento de la concentración de fósforo a partir de las 12 horas de incubación, que resulta paralela al aumento de la intensidad del campo magnético aplicado, obteniéndose valores máximos para la intensidad de 6,4 mT. No obstante, tras el análisis de los datos, dicho aumento no resulta estadísticamente significativo para ninguna de las intensidades de campo magnético estudiadas.

3. Estudio de la concentración de LDH en suero sanguíneo expuesto a un campo magnético de 50 Hz a distintos tiempos, respecto a las intensidades aplicadas de dicho campo

La representación gráfica de los niveles enzimáticos de LDH de suero sanguíneo sometido a la acción de un campo magnético de 50Hz a distintos tiempos y a las intensidades de 1,6, 3,2 y 6,4 mT, frente a los del suero control, se muestra en la figura 49.

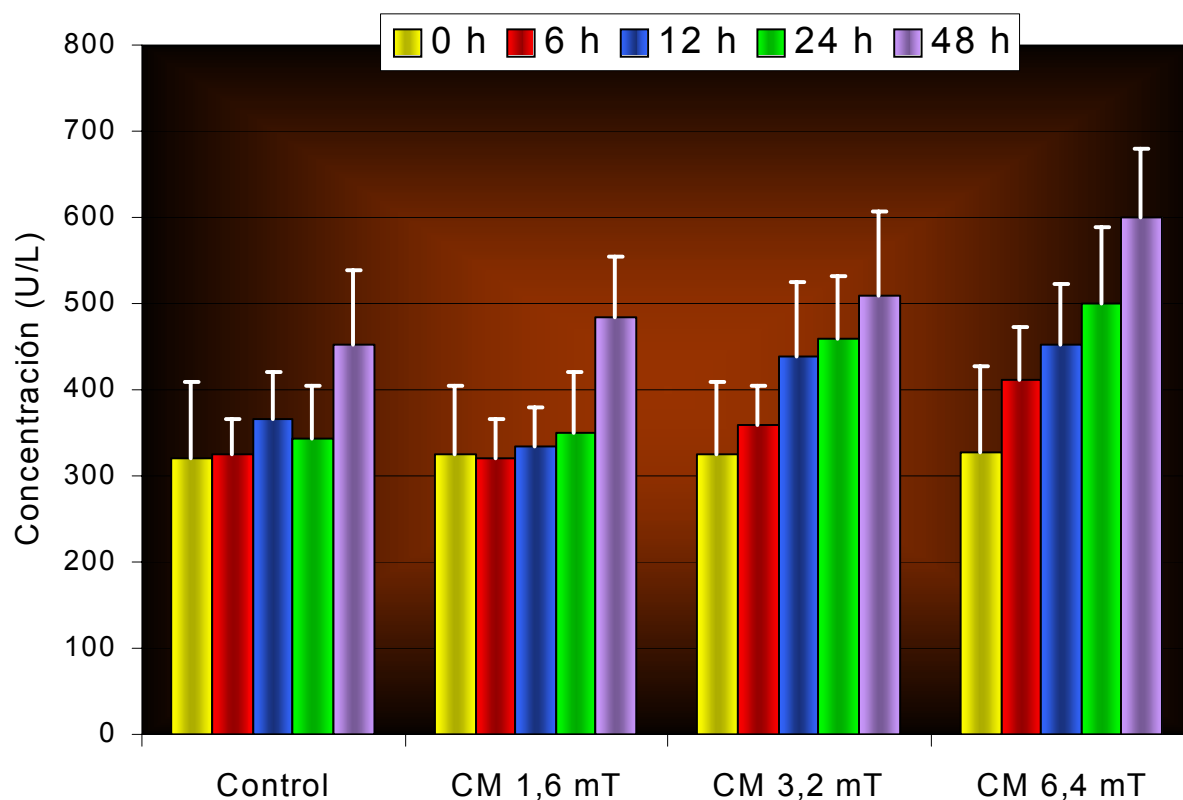


Fig. 49.- Comparativa de las concentraciones de LDH en suero control y expuesto a un CM de 50 Hz a distintos tiempos, según la intensidad de dicho campo (1,6, 3,2 y 6,4 mT).

RESULTADOS

De la gráfica anterior se deduce, tras confrontar los valores de los sueros del grupo control con aquellos correspondientes a sueros expuestos al campo magnético de 50 Hz, que no existen prácticamente diferencias para la intensidad de campo de 1,6 mT, siendo los valores de ambos grupos muy similares.

En lo que respecta a las concentraciones de enzima de los sueros sometidos a la acción del campo apuntado y a las intensidades de 3,2 y 6,4 mT, se observa un ligero incremento de la actividad de la LDH a partir de las 6 h de exposición; dicho aumento, sin embargo, no resulta ser estadísticamente significativo, tras el análisis de los datos, en ninguno de los dos casos.

Se puede concluir, por tanto, como manifestamos con anterioridad, que no se originan cambios estadísticamente significativos en los niveles de LDH de suero sanguíneo sometido a la acción de un campo magnético de 50 Hz y diversas intensidades (1,6, 3,2 y 6,4 mT), en relación con las concentraciones de dicha enzima en sueros sin exposición, a pesar de una tendencia al aumento de las concentraciones de LDH aparentemente pareja a la elevación de la intensidad del campo aplicada, pero que no resulta tener significación estadística.

IV.2.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS *IN VIVO* REALIZADOS.

IV.2.1- Resultados obtenidos en el estudio de las variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, originadas por la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia.

Los resultados que a continuación se exponen corresponden a los experimentos encaminados a la comprobación, *in vivo*, de la hipótesis según la cual los campos electromagnéticos de baja frecuencia tendrían la capacidad de provocar variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y que se llevaron a cabo según se indicó en su momento en el epígrafe III.4.1 del capítulo anterior.

Así, tal y como en el mencionado epígrafe se detalla, el campo magnético a estudio en esta parte de la investigación es el de 27,5 Oersted (2,75 mT) y 50 Hz, generado por la cámara previamente descrita en el apartado III.1.2 de dicho capítulo, y a esta radiación pertenecen los resultados aquí registrados.

En cuanto a los resultados del ensayo encaminado a comprobar un posible sinergismo entre el efecto del campo magnético aludido y contaminantes ambientales metálicos, hemos de recordar que el compuesto de plomo utilizado

para tal fin es el referido en el apartado III.2 de aquel capítulo, así como señalar que los valores obtenidos en este experimento se ofrecen, para una mejor comprensión y claridad, junto con la representación gráfica de los valores obtenidos en los ensayos anteriores de ratones expuestos únicamente a la acción del campo magnético, y que se toman como referencia en este caso.

Como ya se apuntó en el apartado III.5 del capítulo precedente, en primer lugar se procedió a establecer la longitud de onda a la que absorbe el colorante utilizado para el estudio, el rojo neutro; es decir, la absorbancia a la que este compuesto presenta un máximo, a fin de decidir la región del espectro más apta para nuestros propósitos.

Los resultados de esta determinación, previa al experimento en sí, vienen reflejados en las gráficas de las figuras 50 y 51, correspondiendo los picos hallados a dos longitudes de onda diferentes para el rojo neutro, a una concentración del mismo de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Se puede observar en las mencionadas gráficas, que a continuación se exponen, cómo nuestro colorante muestra un máximo de absorción a la longitud de onda de 540 nm en la región visible del espectro, y otro a 275 nm.

RESULTADOS

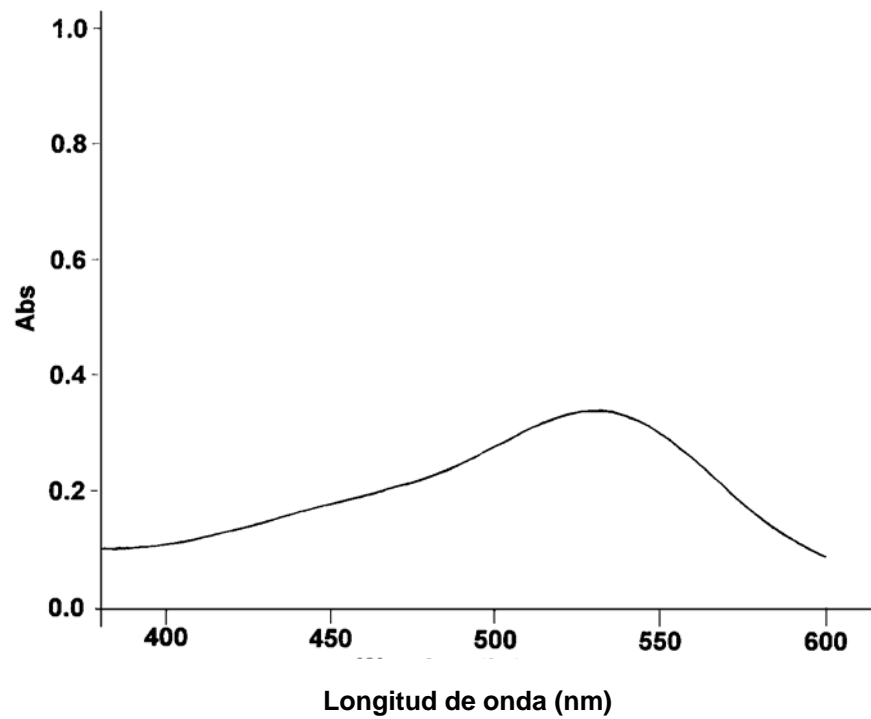


Fig. 50.- Espectro del rojo neutro en la región del visible

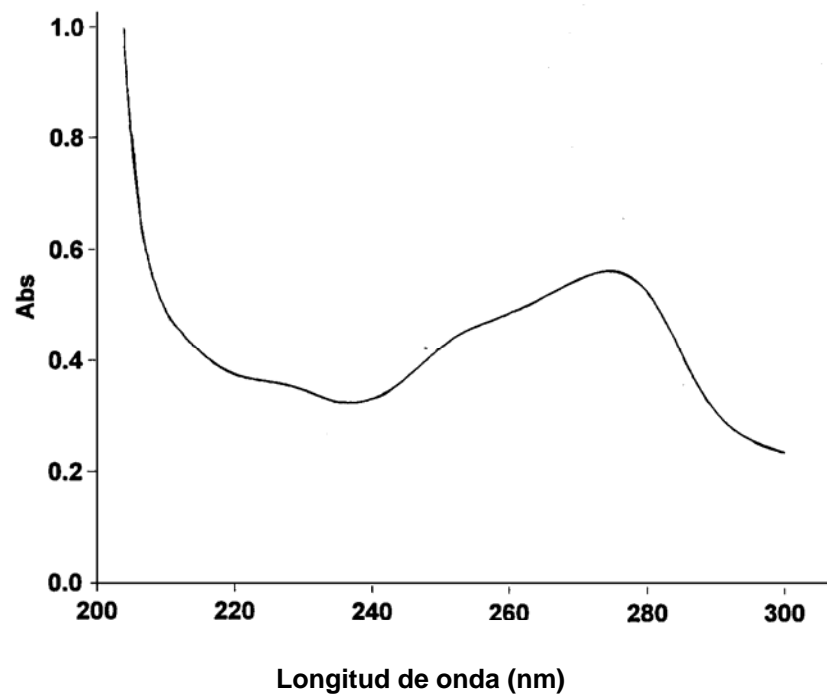


Fig. 51.- Espectro del rojo neutro en la región del ultravioleta

Ya que las proteínas absorben a 280 nm, y a fin de evitar interferencias, se eligió para el ensayo la longitud de onda de 540 nm, en la región visible del espectro.

De las cinco repeticiones del experimento llevadas a cabo, cada una de ellas constando de doce animales de experimentación, se obtienen unos valores que son normalizados a la media de los mismos y expresados como media \pm DE, siguiendo el procedimiento estadístico anteriormente descrito en el apartado III.5 del capítulo precedente.

Basándonos en estos valores se elaboran las gráficas que a continuación se exponen en las figuras 52 y 53. Ambas representan la absorción, a 540 nm, del rojo neutro existente en el cerebro de las series de ratones indicadas, con sus distintos tratamientos. Se han elaborado dos gráficas a fin de facilitar la contrastación de los datos obtenidos en el caso de cerebro de ratones expuestos a la acción del campo magnético en cuestión versus cerebros “control”, sin exposición a campo magnético, y los resultantes del tratamiento combinado del campo magnético y la administración de plomo.

Así pues, en la gráfica de la figura 52 se comparan los resultados obtenidos con y sin tratamiento de plomo, correspondiendo las barras de color amarillo a los datos provenientes de los cerebros de ratones control, mientras que

RESULTADOS

las verdes representan los datos de cerebro de ratones expuestos a campo magnético.

En dicha gráfica aparece con la denominación de “blanco” la absorbancia correspondiente al extracto sobrenadante del cerebro control, es decir, aquel perteneciente a ratones mantenidos en ausencia de campo magnético y sin inyección de rojo neutro previa al sacrificio.

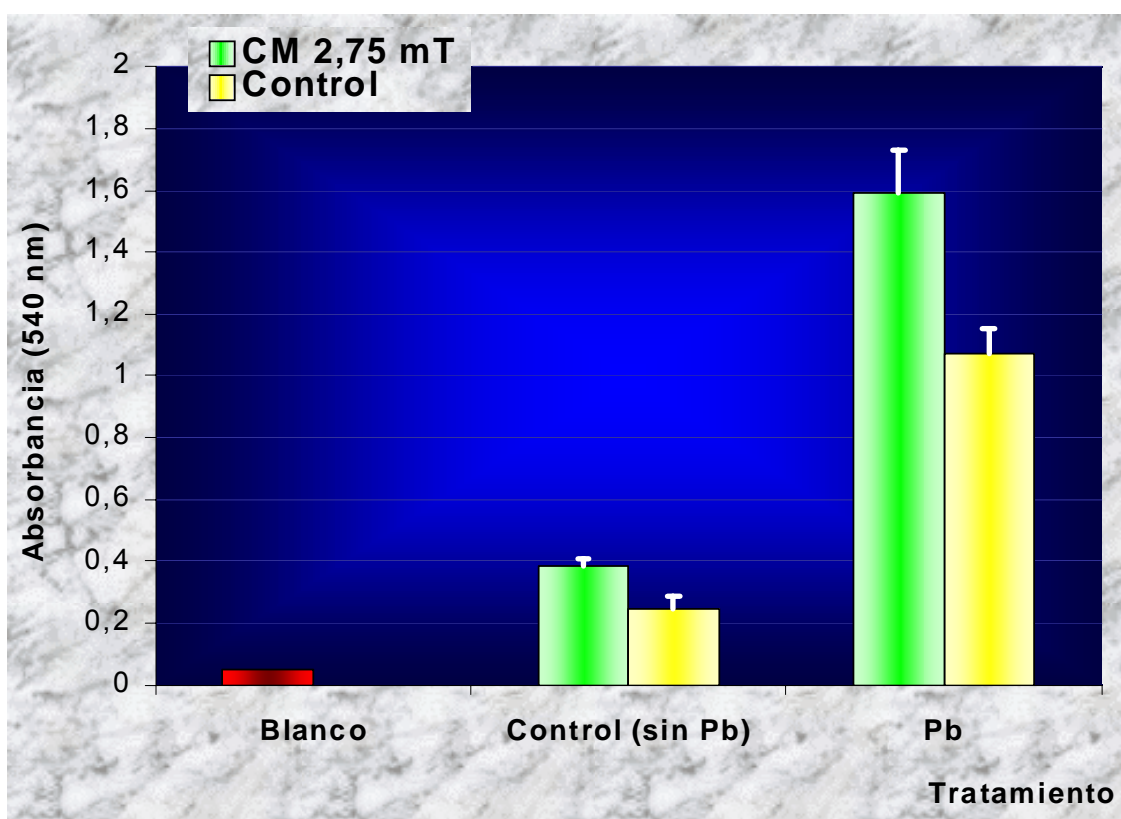


Fig. 52.- Absorbancia del rojo neutro existente en cerebro de ratones tratados con plomo y expuestos a un campo magnético de 50 Hz y 2,75 mT, por paso del colorante a través de la barrera hematoencefálica tras su administración intravenosa.

Se comprueba, al examinar la gráfica, que hay un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los ratones que fueron expuestos a la acción del campo magnético, tanto en el caso de los grupos a los

RESULTADOS

que se administró el compuesto de plomo, como en aquellos sin dicho tratamiento.

En ambos grupos –tratadas con plomo y sin tratar- las diferencias entre las series de ratones expuestos a la radiación y los no expuestos resultaron ser, tras el tratamiento estadístico de los datos, estadísticamente significativas, con valores de $p < 0,05$.

En cuanto a la influencia del plomo en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los animales estudiados, ésta se plasma en la gráfica 53, en la que se han representado los valores ya señalados, agrupados esta vez atendiendo al tratamiento con campo magnético, constituyendo las barras de color azul los datos correspondientes a los cerebros de ratones administrados con plomo, y las de color amarillo a aquellos sin tratar con el metal.

De la gráfica de esta figura se concluye que existe una diferencia significativa entre los grupos a los que fue administrado el compuesto de plomo y aquellos sin dicho tratamiento, resultando, tras proceder al análisis oportuno, esta diferencia estadísticamente significativa, al ser $p < 0,05$. Esto, en principio, querría decir que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los ratones tratados con plomo aumenta frente a la de los ratones a los que no se aplicó el citado tratamiento, también en el caso de los grupos sometidos a la acción del campo magnético aplicado que, como señalamos anteriormente, influye al provocar un aumento de por sí en dicha permeabilidad.

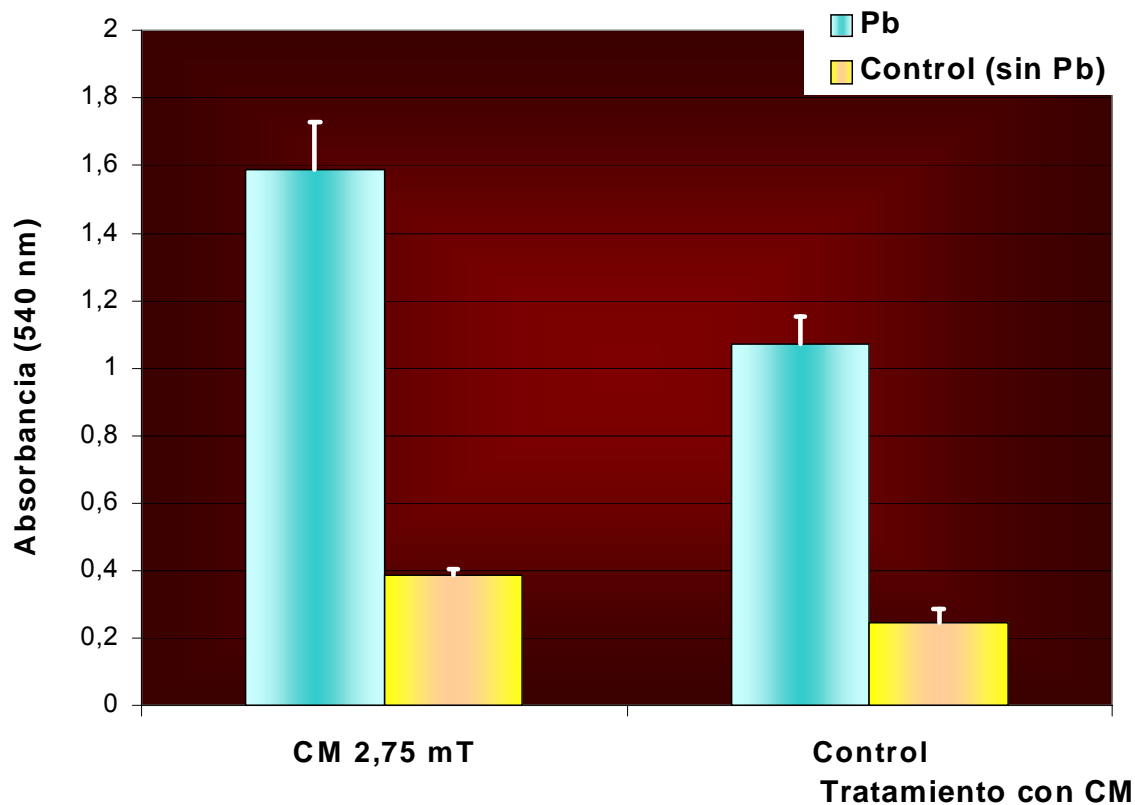


Fig. 53.- Absorbancia del rojo neutro existente en cerebro de ratones tratados con dosis de plomo y exposición a campo magnético de 50 Hz y 2,75 mT, por paso del colorante a través de la barrera hematoencefálica tras su administración intravenosa.

IV.2.2.- Resultados obtenidos en la determinación y estudio de alteraciones en las propiedades eléctricas de tejidos de rata mediante irradiación con campos electromagnéticos de radiofrecuencia

Siguiendo el curso de nuestra exposición de resultados, ofrecemos, por último, los arrojados por el estudio llevado a cabo en tejidos sistémicos de rata a fin de determinar, mediante irradiación con campos electromagnéticos de

radiofrecuencia, las propiedades eléctricas (conductividad y permitividad) de los mencionados órganos, así como las variaciones que éstas pueden presentar debido a una sobrecarga orgánica de los metales a estudio, y que se desarrolló tal y como se detalla en el capítulo precedente, siendo los datos aquí expuestos fruto del tratamiento estadístico oportuno de los valores recogidos en todas las repeticiones de cada ensayo que en aquél se refiere.

IV.2.2.a.- Resultados de los análisis de sangre de las ratas tratadas con metales

En la tabla 14 se detallan los parámetros bioquímicos, enzimáticos y hematológicos estudiados en la sangre de ratas tratadas con el compuesto de hierro caracterizado en el apartado III.2 del capítulo anterior, y obtenida tal y como se expuso en su momento en el epígrafe III.4.2.c del mencionado capítulo. Como valores de referencia se proporcionan los obtenidos en los análisis de sangre de ratas sin tratamiento alguno, a las que no se administró el metal, y a las que nos referimos como “control”.

Los valores obtenidos en los análisis se normalizan, como es habitual y hemos venido apuntando en los distintos párrafos de este capítulo, a la media, y son expresados como media \pm DE.

RESULTADOS

PARÁMETROS	CONTROL	HIERRO
1º Hematología		
Eritrocitos ($10^6/\text{mm}^3$)	$7,015 \pm 0,49$	$6,3 \pm 0,4$
Hemoglobina (g/dL)	$12,75 \pm 0,35$	$12,35 \pm 0,68$
Hematocrito (%)	$37,30 \pm 0,8$	$38,07 \pm 3,10$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$896 \pm 48,9$	$951 \pm 76,7$
2º Parámetros bioquímicos		
Glucosa (g/100mL)	166 ± 13	198 ± 5
Proteínas totales (g/100mL)	$6,3 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,89$
Albumina (mg/100mL)	$3,7 \pm 0,12$	$3,03 \pm 3$
Urea (mg/100mL)	$33,0 \pm 2$	$25 \pm 8,3$
Bilirrubina total (mg/100mL)	$0,25 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,04$
Calcio sérico (mg/100mL)	$11,7 \pm 0,9$	$9,8 \pm 1,79$
Hierro sérico ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	$116,6 \pm 13$	$137,5 \pm 5,5$
Fósforo (mg/100mL)	$7,5 \pm 1,3$	$10,15 \pm 0,55$
Magnesio (mg/100mL)	$2,2 \pm 0,33$	$2,2 \pm 0,45$
3º Enzimas		
GOT (U/L)	$93,5 \pm 12,5$	$91,25 \pm 11,1$
GPT (U/L)	$81 \pm 12,9$	$100 \pm 4,9$
Gamma-GT (U/L)	0	$0,5 \pm 0,1$
LDH (U/L)	$252,5 \pm 30,5$	377 ± 50
CPK (U/L)	$277,5 \pm 49,5$	393 ± 60
Fosfatasa alcalina (U/L)	$756,25 \pm 139$	$611 \pm 71,6$

Tabla 14.- Parámetros bioquímicos, enzimáticos y hematológicos en sangre de ratas tratadas con dosis crecientes de hierro, frente a los valores normales.

De los valores obtenidos en la analítica correspondiente a la sangre de los animales administrados con hierro intraperitoneal durante los 12 días de tratamiento se deduce, tras el oportuno análisis de los datos, que únicamente aparecen diferencias en los parámetros bioquímicos glucosa y hierro, y en los enzimáticos LDH y GPT, todos ellos aumentados con respecto a los valores control.

RESULTADOS

La gráfica de la figura 54 refleja la representación gráfica de las variaciones halladas en los valores de estos parámetros. Al realizarse el correspondiente análisis estadístico de los mismos se concluye que tan sólo constituyen diferencias estadísticamente significativas aquellas observadas en las concentraciones de glucosa y LDH, con $p < 0,05$; no así los valores de hierro sérico ni los de GPT que, a pesar de su aparente aumento, no se establecen como cambios significativos. De igual manera, el resto de los parámetros analizados no muestra diferencias estadísticamente significativas al ser comparados con los valores normales.

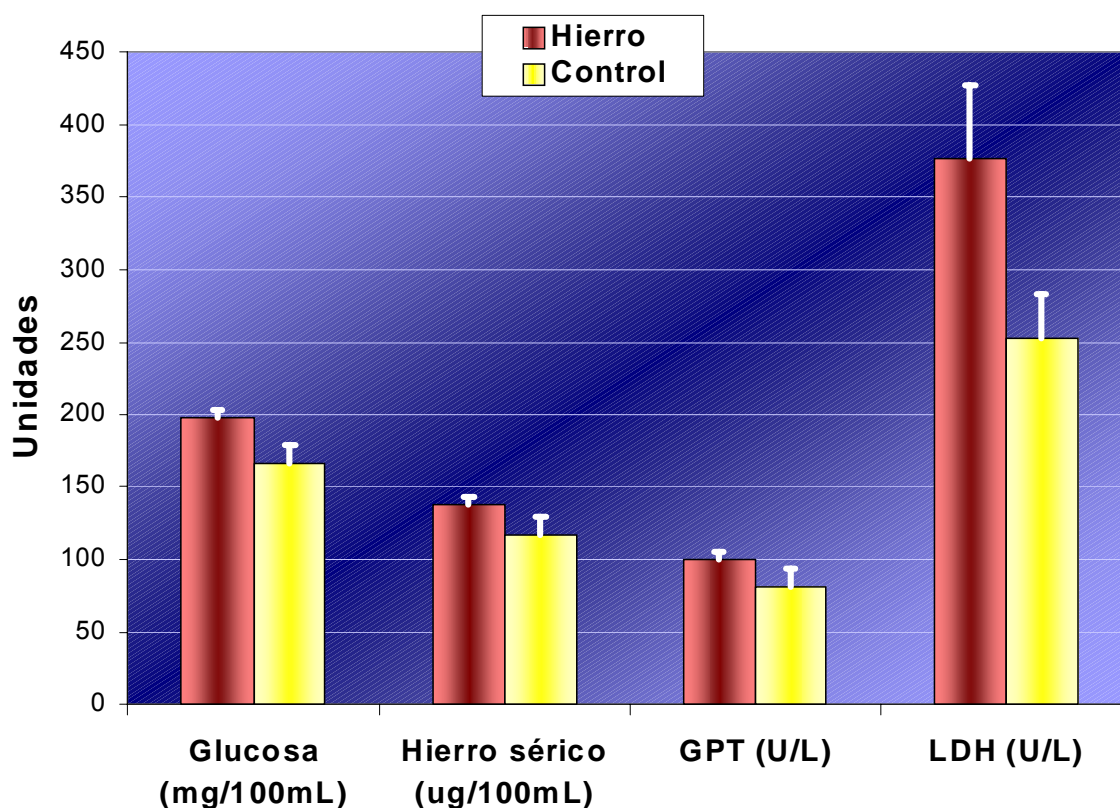


Fig. 54.- Parámetros bioquímicos y enzimáticos en sangre de ratas tratadas con hierro que muestran variaciones respecto a las concentraciones normales.

RESULTADOS

La tabla 15 que a continuación se muestra registra los mismos parámetros bioquímicos, enzimáticos y hematológicos mostrados en la tabla anterior, aunque en este caso del grupo tratado con inyecciones del compuesto de plomo descrito en el apartado II.2 del capítulo precedente, teniendo como referencia las concentraciones sanguíneas de los mismos parámetros en las ratas que constituyeron el grupo control.

PARÁMETROS	CONTROL	PLOMO
1º Hematología		
Eritrocitos ($10^6/\text{mm}^3$)	$7,015 \pm 0,49$	$5,5 \pm 0,7$
Hemoglobina (g/dL)	$12,75 \pm 0,35$	$10,76 \pm 0,67$
Hematocrito (%)	$37,30 \pm 0,8$	$31,46 \pm 2,12$
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$896 \pm 48,9$	$1.136 \pm 108,5$
2º Parámetros bioquímicos		
Glucosa (g/100mL)	166 ± 13	$110,6 \pm 4,7$
Proteínas totales (g/100mL)	$6,3 \pm 0,2$	$5,62 \pm 0,35$
Albúmina (mg/100mL)	$3,7 \pm 0,12$	$2,8 \pm 0,2$
Urea (mg/100mL)	$33,0 \pm 2$	$24,25 \pm 1,47$
Ácido úrico (mg/100mL)	$2,4 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,10$
Bilirrubina total (mg/100mL)	$0,25 \pm 0,05$	$0,375 \pm 0,24$
Calcio sérico (mg/100mL)	$11,7 \pm 0,9$	$0,85 \pm 1,30$
Hierro sérico ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	$116,6 \pm 13$	$155,25 \pm 33,16$
Fósforo (mg/100mL)	$7,5 \pm 1,3$	$8,05 \pm 0,55$
Magnesio (mg/100mL)	$2,2 \pm 0,33$	$2,25 \pm 0,2$
3º Enzimas		
GOT (U/L)	$93,5 \pm 6,5$	$160,5 \pm 8,55$
GPT (U/L)	$81 \pm 12,9$	$77,5 \pm 18$
Gamma-GT (U/L)	0	$0,6 \pm 0,4$
LDH (U/L)	$252,5 \pm 30,5$	$447,6 \pm 60,4$
CPK (U/L)	$277,5 \pm 49,5$	$381,3 \pm 60$
Fosfatasa alcalina (U/L)	$756,25 \pm 139$	$591,25 \pm 170$

Tabla 15.- Parámetros bioquímicos, enzimáticos y hematológicos en sangre de ratas tratadas con dosis crecientes de plomo, frente a los valores normales.

RESULTADOS

Tras proceder al análisis de los valores reflejados en dicha tabla se concluye, en cuanto a los parámetros bioquímicos, que en las ratas tratadas con plomo la concentración de proteínas totales en sangre es inferior a la observada en la sangre de los animales sin tratar. Se encuentran asimismo disminuidas las concentraciones de glucosa, calcio sérico, ácido úrico y urea, mientras que las de bilirrubina presentan un aumento respecto a los valores normales del mismo parámetro. Todas estas variaciones resultaron ser estadísticamente significativas tras el análisis estadístico oportuno, con $p < 0,05$. La concentración de hierro sérico refleja, por su parte, una tendencia a la disminución que no se concretó como estadísticamente significativa.

En lo relativo a los parámetros enzimáticos resultantes de los análisis, se observa un incremento importante en las concentraciones de la zinc-metaloenzima LDH y de la transaminasa GOT, con $p < 0,05$, mientras que del tratamiento de los valores hematológicos se desprende que las ratas tratadas con plomo presentan unos valores de hematocrito y hemoglobina por debajo de lo normal, a la vez que la concentración de plaquetas está muy aumentada, apareciendo estos cambios como estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Las conclusiones emanadas de los datos reflejados en la tabla anterior y que se acaban de exponer, se encuentran representadas gráficamente en las figuras 55 y 56, en las que lo antedicho se aprecia con mayor claridad.

RESULTADOS

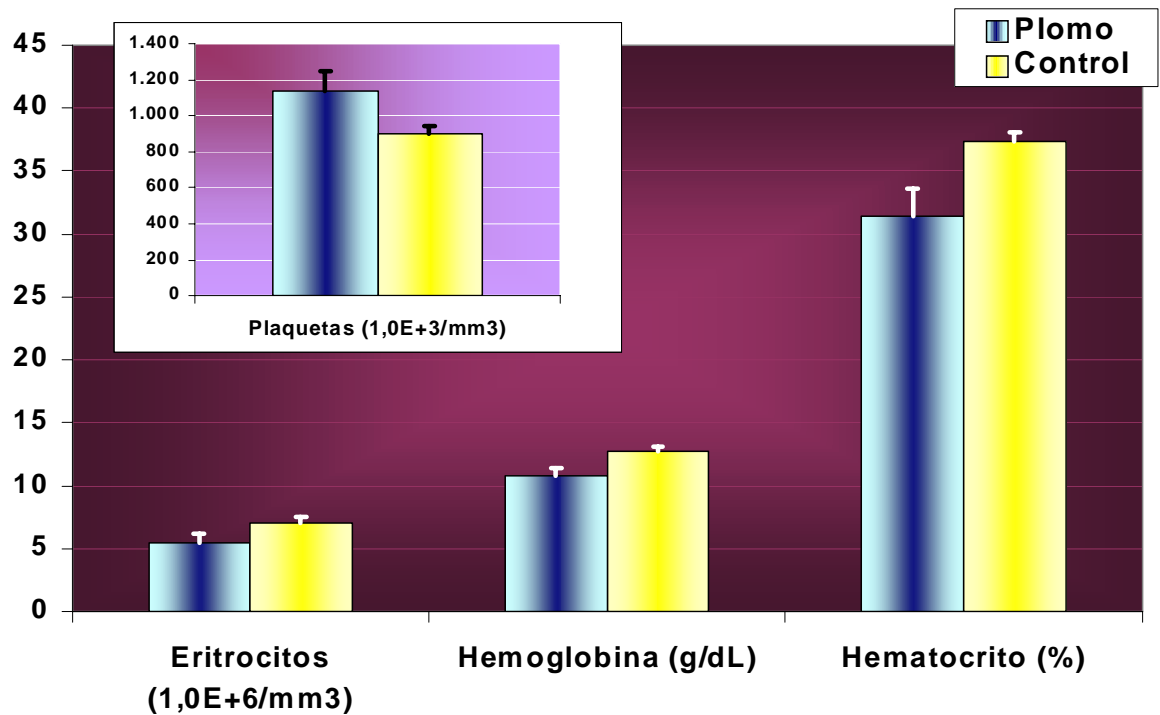


Fig. 55.- Parámetros hematológicos en sangre de ratas tratadas con plomo, que muestran variaciones respecto a las concentraciones normales.

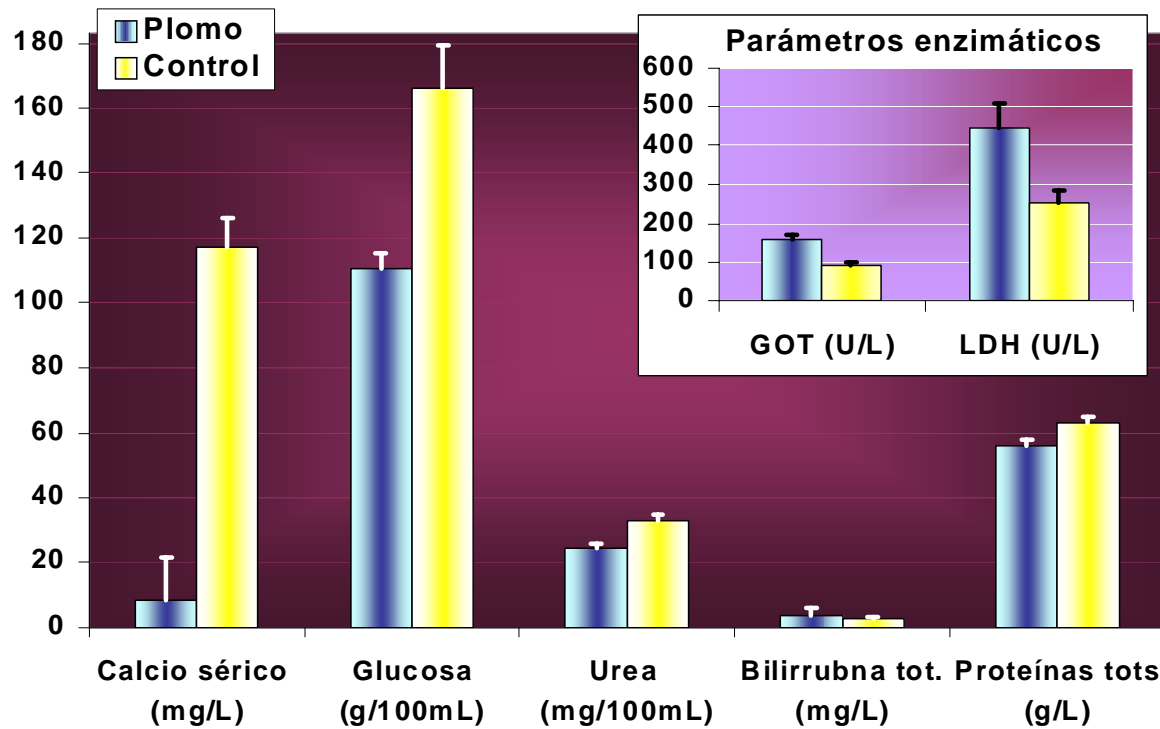


Fig 53.- Parámetros bioquímicos y enzimáticos en sangre de ratas tratadas con plomo, que muestran variaciones respecto a las concentraciones normales.

IV.2.2.b.- Resultados de la determinación de acumulación de metal en los órganos de ratas tratadas, mediante ICP-MS

Los resultados que exponemos a continuación son aquellos derivados de la evaluación, mediante análisis con ICP-MS (plasma de acoplamiento inductivo asociado a espectrómetro de masas), de la cantidad de metal acumulado en los distintos órganos de los sujetos del experimento, a fin de determinar la influencia de los mencionados metales en las posibles variaciones de las características eléctricas de los tejidos, tal y como se refirió en el apartado III.4.2.d del capítulo anterior.

Como previamente se ha expuesto, en lo relativo al análisis de elementos, se encuentra hoy en día toda una serie de métodos perfectamente tecnificados y de alto costo; no existe, sin embargo, un método perfecto para el análisis de elementos presentes a concentraciones inferiores a la millonésima parte por mililitro de muestra. La selección del correspondiente método de análisis o técnica de determinación se debe atener, pues, a ciertos cánones de orientación según la matriz y el elemento en cuestión. En sentido estricto, el resultado de un análisis es correcto cuando el valor ha sido verificado por más de un método analítico, todos ellos independientes.

Un buen acercamiento al resultado correcto se logra con la determinación del elemento en materiales de referencia estandarizados, siempre y cuando éstos

sean sometidos a los mismos pasos de pre-tratamiento que la muestra (pasos pre-analíticos), e igualmente contengan el elemento de interés en el mismo rango de concentración que la muestra.

Debe tomarse en consideración no sólo el peligro de una contaminación, sino también el de pérdidas del elemento a analizar. Este peligro existe principalmente en los pasos previos al análisis, durante la preparación de la muestra en procesos de secado o de digestión ácida.

Por lo tanto, y a tenor de lo dicho, antes de efectuar la determinación de las concentraciones de plomo y hierro en los distintos órganos preparados para tal fin en este ensayo, se procede a la calibración del equipo y la técnica como a continuación se expone.

El análisis se lleva acabo mediante la adición de un estándar externo a fin de seguir, y finalmente corregir mediante cálculos, cambios en la sensibilidad del detector.

La figura 57, que a continuación se adjunta, muestra los gráficos de calibración para las soluciones estándar con los parámetros calculados en Excel. Los isótopos monitorizados y con los que la calibración es llevada a cabo son Pb^{206} , Hg^{202} , Cd^{114} y Fe^{56} . Además, es añadida una solución estándar de rodio a cada muestra, a fin de obtener concentraciones de metal de 10 ppb.

RESULTADOS

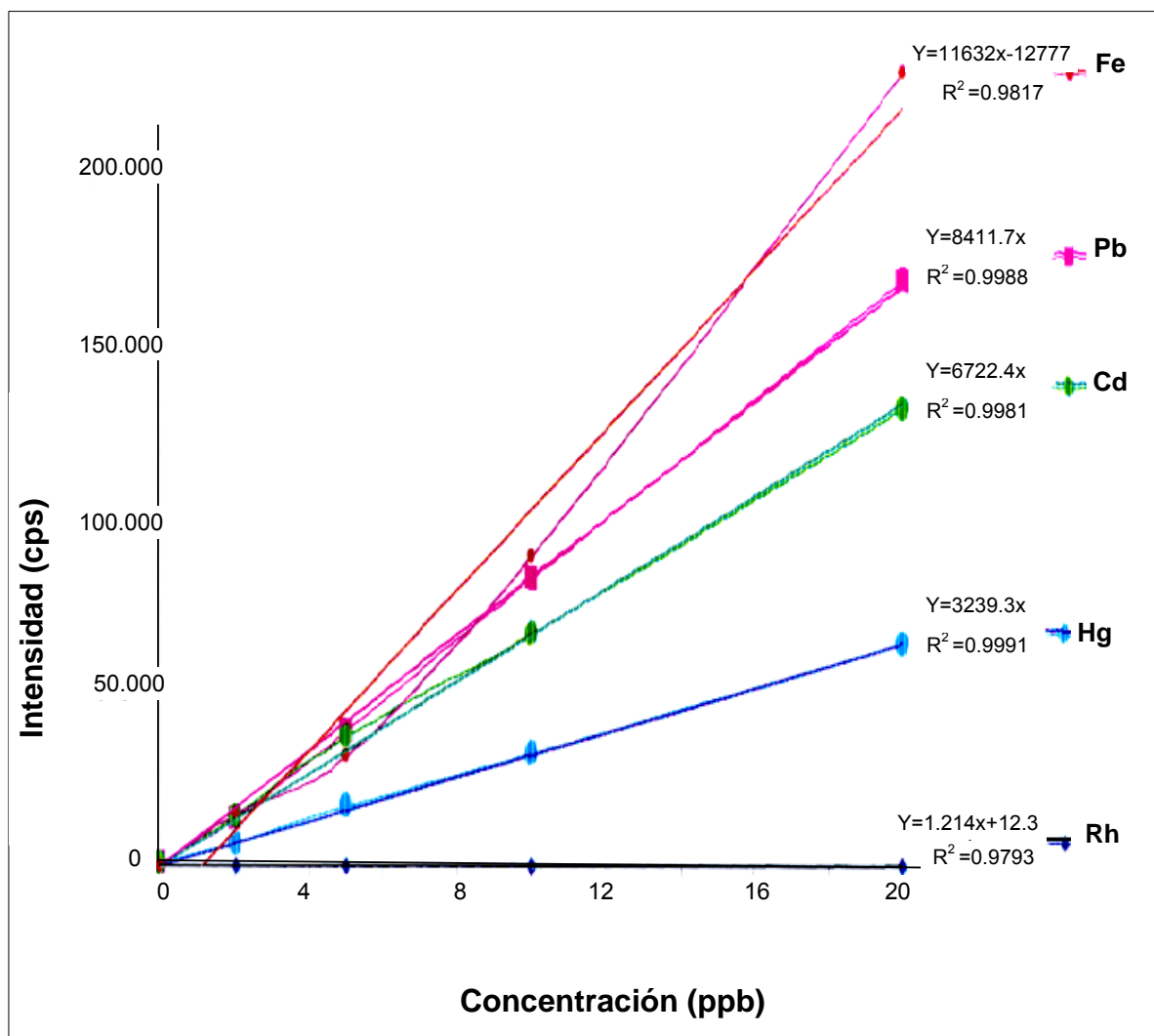


Fig. 57.- Gráficos de calibración del ICP-MS para los isótopos de hierro, plomo, cadmio y mercurio: Pb^{206} , Hg^{202} , Cd^{114} y Fe^{56} .

La desviación estándar para los gráficos de calibración presentados en la figura anterior, en lo que a los metales a estudio se refiere, aparece reflejada en la tabla 16.

Elemento	DE
Pb ²⁰⁶	3,1%
Fe ⁵⁶	13,2%

Tabla 16.- Desviación estándar para los gráficos de calibración de plomo y hierro.

Una vez establecidas las gráficas de calibrado y puesto a punto de esta manera el equipo analítico, se realiza la determinación de la cantidad de metales, hierro y plomo, presente en los distintos órganos de las ratas sujeto del presente ensayo.

Los resultados de dicha determinación para los tejidos de los individuos que constituyeron el grupo control, es decir, aquellos que no fueron sometidos a tratamiento con metal alguno, vienen reflejados en la tabla 17. Los valores que aparecen en la tabla corresponden a una cantidad de 0,5 g de tejido, y se expresan como media de los valores obtenidos \pm DE.

Los datos aquí registrados indican que el plomo se acumula, tras el tratamiento, descrito en su momento, de doce días con inyecciones intra-peritoneales de nitrato de plomo, en hígado y páncreas principalmente, hallándose asimismo concentraciones importantes en músculo. A su vez se comprueba que el hierro aparece almacenado con preferencia en el páncreas.

RESULTADOS

TEJIDO (0,5 g)	CONTROL	
	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Hígado	1,01 ± 0,01	0,1 ± 0,1
Pulmón	0,83 ± 0,01	1,8 ± 0,1
Riñón	0,86 ± 0,01	0,3 ± 0,1
Páncreas	1,14 ± 0,01	0,8 ± 0,1
Músculo	0,92 ± 0,01	0,3 ± 0,1

Tabla 17-. Concentraciones de plomo y hierro en tejidos de rata del grupo control.

Por su parte, los resultados obtenidos de la evaluación de concentraciones de hierro y plomo en los tejidos de las ratas a las que fueron administrados, respectivamente, estos metales, se muestran en la tabla 18. Lo indicado al presentar la tabla anterior respecto a la cantidad de tejido para la que se realiza la determinación, es válido asimismo para la tabla que se acompaña a continuación.

Hemos de señalar, de igual manera, que se han determinado exclusivamente las concentraciones de plomo en los tejidos del grupo de ratas tratadas con inyecciones de este metal y, en las siguientes determinaciones, se ha medido únicamente la cantidad de hierro presente en los órganos de las ratas tratadas con inyecciones del compuesto de hierro correspondiente.

TEJIDO (0,5 g)	Grupo tratado con plomo	Grupo tratado con hierro
	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Hígado	1,88 ± 0,01	0,1 ± 0,1
Pulmón	0,83 ± 0,01	2,0 ± 0,1
Riñón	0,92 ± 0,01	0,3 ± 0,1
Páncreas	1,51 ± 0,01	1,3 ± 0,1
Músculo	1,00 ± 0,01	0,2 ± 0,1

Tabla 18.- Concentraciones de metal en tejidos de rata de los grupos tratados con plomo y hierro.

En la gráfica de la figura 58 se representan las concentraciones de ambos metales a estudio, expresados en ppm, respecto a los valores control, en los tejidos analizados.

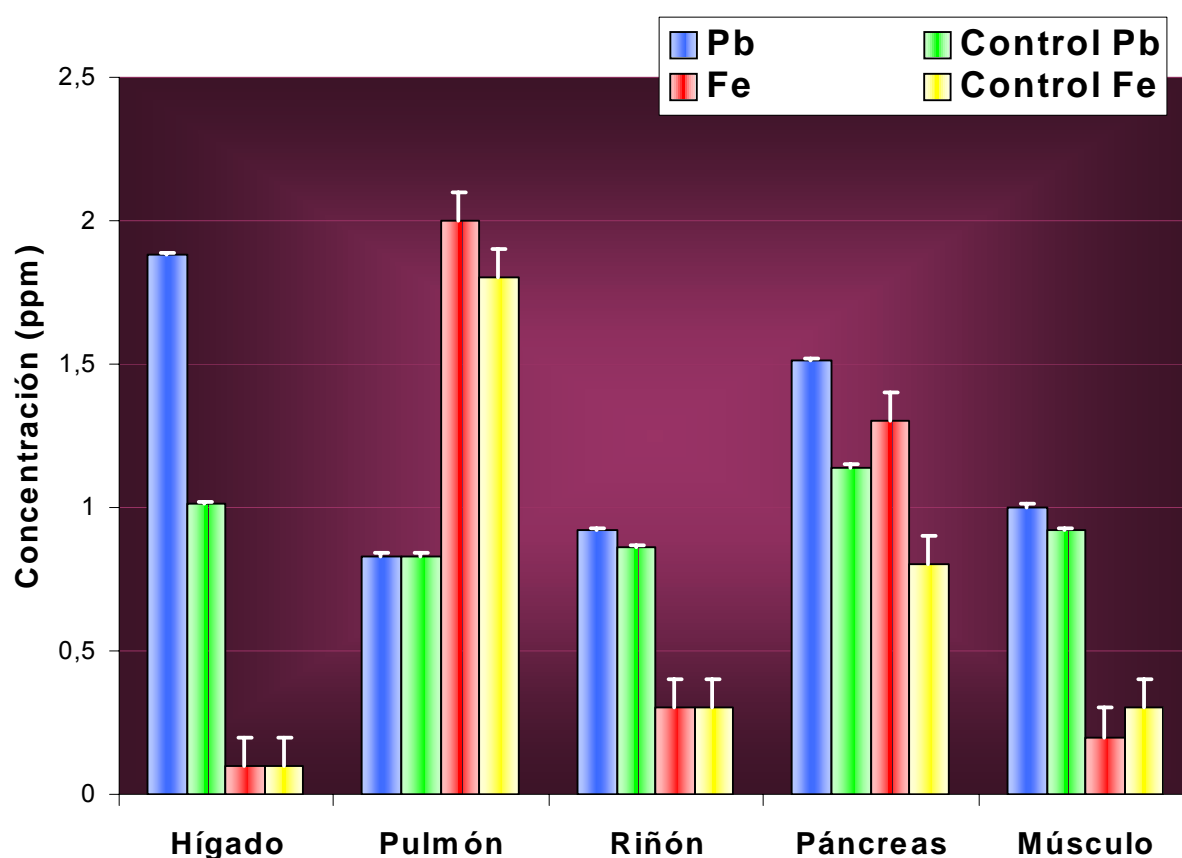


Fig. 58.- Concentración de Pb y Fe en ppm \pm DE en tejidos de ratas control y tratadas con dichos metales.

Se comprueba nuevamente cómo el plomo se acumula preferentemente en hígado, páncreas y músculo, resultando además el aumento de estas concentraciones, al ser comparadas con las de los tejidos del grupo control, estadísticamente significativas, con $p < 0,05$. Por otra parte se constata que el hierro se encuentra mayoritariamente acumulado en pulmón y páncreas en el

caso de la sobrecarga orgánica del metal originada por el tratamiento ya indicado, resultando este cúmulo de hierro estadísticamente significativo al compararlo con los tejidos control.

IV.2.2.c.- Resultados obtenidos en la determinación de la permitividad dieléctrica compleja en los tejidos a estudio mediante radiofrecuencia

Finalmente, y para cerrar este capítulo, pasamos a la exposición de los resultados alcanzados con el estudio de las variaciones que en las propiedades eléctricas de los tejidos puede provocar una sobrecarga orgánica de determinados metales, evaluación esta que se llevó a cabo mediante medición de los coeficientes complejos de reflexión y transmisión de las muestras de tejido biológico utilizando un analizador de red (VNA), tal y como se detalla en el epígrafe III.4.2.d del capítulo precedente.

Recordemos que los experimentos se llevaron a cabo irradiando las muestras a la frecuencia de 2,45 GHz, así como que las citadas muestras consistieron en cortes de distintos órganos de ratas tratadas con dosis crecientes de los compuestos de hierro y plomo descritos en el apartado III.2 del capítulo anterior, como se describió en su momento en los párrafos III.4.2.a y III.4.2.b de dicho capítulo.

RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos se ha utilizado, al igual que hemos visto para el resto de los resultados, el análisis de varianza unifactorial ANOVA, realizándose un test de comparación múltiple Tukey-Kramer para cada uno de los cinco tejidos estudiados, considerando en todos los casos tanto la permitividad, como la conductividad.

En las tablas y figuras adjuntas se confrontan los valores obtenidos en las distintas repeticiones del ensayo para los grupos de ratas tratadas con disoluciones de iones metálicos, y aquellos resultantes de los tejidos de las ratas que constituyeron el denominado grupo “control”. Las barras de error que aparecen en las figuras corresponden a la desviación estándar (DE) para intervalos de confianza del 95%.

Las dosis de compuesto metálico administradas a cada uno de los grupos de estudio aparecen reflejadas en la tabla 19.

Compuesto químico	Dosis media (mg/Kg peso)
FeSO ₄	0,06
Pb(NO ₃) ₂	0,05

Tabla 19.- Compuestos metálicos y dosis medias administradas a los grupos con ellos tratados.

RESULTADOS

En la tabla 20, que a continuación se muestra, se registran los valores obtenidos en el estudio de las propiedades dieléctricas (permitividad dieléctrica, ϵ , y conductividad, σ) de los cinco tejidos evaluados para el grupo control:

TEJIDO	CONTROL	
	ϵ	σ
Hígado	$42,6 \pm 0,4$	$1,52 \pm 0,08$
Pulmón	$47,36 \pm 0,69$	$1,64 \pm 0,09$
Riñón	$49,84 \pm 1,09$	$1,77 \pm 0,21$
Páncreas	$41,7 \pm 0,78$	$1,58 \pm 0,09$
Músculo	$49,5 \pm 0,64$	$1,77 \pm 0,05$

Tabla 20.- Propiedades dieléctricas (permitividad y conductividad) de los tejidos estudiados para el grupo control.

Los resultados generados en el análisis de las propiedades eléctricas de los tejidos estudiados en los grupos tratados con metales, referidos a los valores hallados para los mismos tejidos del grupo control, se concretan en las tablas 21 y 22 que aparecen seguidamente.

TEJIDO	Permitividad (ϵ)		
	Plomo	Hierro	Control
Hígado	$45,4 \pm 0,38$	$44,00 \pm 0,36$	$42,6 \pm 0,4$
Pulmón	$38,99 \pm 0,34$	$45,90 \pm 1,30$	$47,36 \pm 0,69$
Riñón	$45,70 \pm 1,18$	$43,12 \pm 1,19$	$49,84 \pm 1,09$
Páncreas	$46,83 \pm 1,23$	$46,93 \pm 1,04$	$41,7 \pm 0,78$
Músculo	$48,14 \pm 0,45$	$46,88 \pm 1,03$	$49,5 \pm 0,64$

RESULTADOS

Tabla 21.- Estudio de las variaciones de permitividad dieléctrica entre tejido de ratas control y tratadas con sobrecarga de plomo y hierro.

Al efectuar un análisis detallado de los valores obtenidos, una vez normalizados y expresados como media \pm DE, tal y como se muestran en la tabla, se concluye la existencia de diferencias estadísticamente significativas (con $p < 0,05$) entre los grupos a los que se administraron metales, respecto a los valores del grupo control, para hígado, pulmón, riñón, páncreas y músculo en el caso del grupo tratado con plomo, es decir, en la totalidad de los tejidos estudiados.

En lo que respecta a los tejidos del grupo tratado con hierro, resultaron ser estadísticamente significativas las diferencias con el grupo control en hígado, riñón, páncreas y músculo, con $p < 0,05$, no apareciendo como significativas las diferencias entre los valores control y los del grupo tratado con hierro en el caso del pulmón.

TEJIDO	Conductividad (σ)		
	Hierro	Plomo	Control
<i>Hígado</i>	$1,18 \pm 0,07$	$1,20 \pm 0,16$	$1,52 \pm 0,08$
<i>Pulmón</i>	$1,28 \pm 0,09$	$1,19 \pm 0,10$	$1,64 \pm 0,09$
<i>Riñón</i>	$1,12 \pm 0,08$	$1,21 \pm 0,20$	$1,77 \pm 0,21$
<i>Páncreas</i>	$1,30 \pm 0,09$	$1,35 \pm 0,10$	$1,58 \pm 0,09$
<i>Músculo</i>	$1,28 \pm 0,25$	$1,19 \pm 0,22$	$1,77 \pm 0,05$

Tabla 22.- Estudio de las variaciones de la conductividad entre tejido de ratas control y tratadas con sobrecarga de hierro y plomo.

En lo que a las variaciones en la conductividad de los tejidos se refiere, como se puede apreciar en la tabla correspondiente, tanto los tejidos pertenecientes a los individuos a los que se administró hierro, como a los que se inyectó plomo, presentan valores de conductividad inferiores a aquellos correspondientes a los tejidos de los individuos del grupo control, siendo las diferencias apuntadas, para la totalidad de los tejidos estudiados, de significación estadística, con $p < 0,05$.

El análisis gráfico de las propiedades eléctricas de cada órgano por separado, comparando los valores de los diferentes grupos de estudio, tanto para la permitividad como para la conductividad, se expone a continuación en las figuras adjuntas.

- **Hígado:**

Los valores hallados para los cortes de hígado realizados y evaluados mediante irradiación con radiofrecuencia, vienen reflejados en la gráfica de la figura 59.

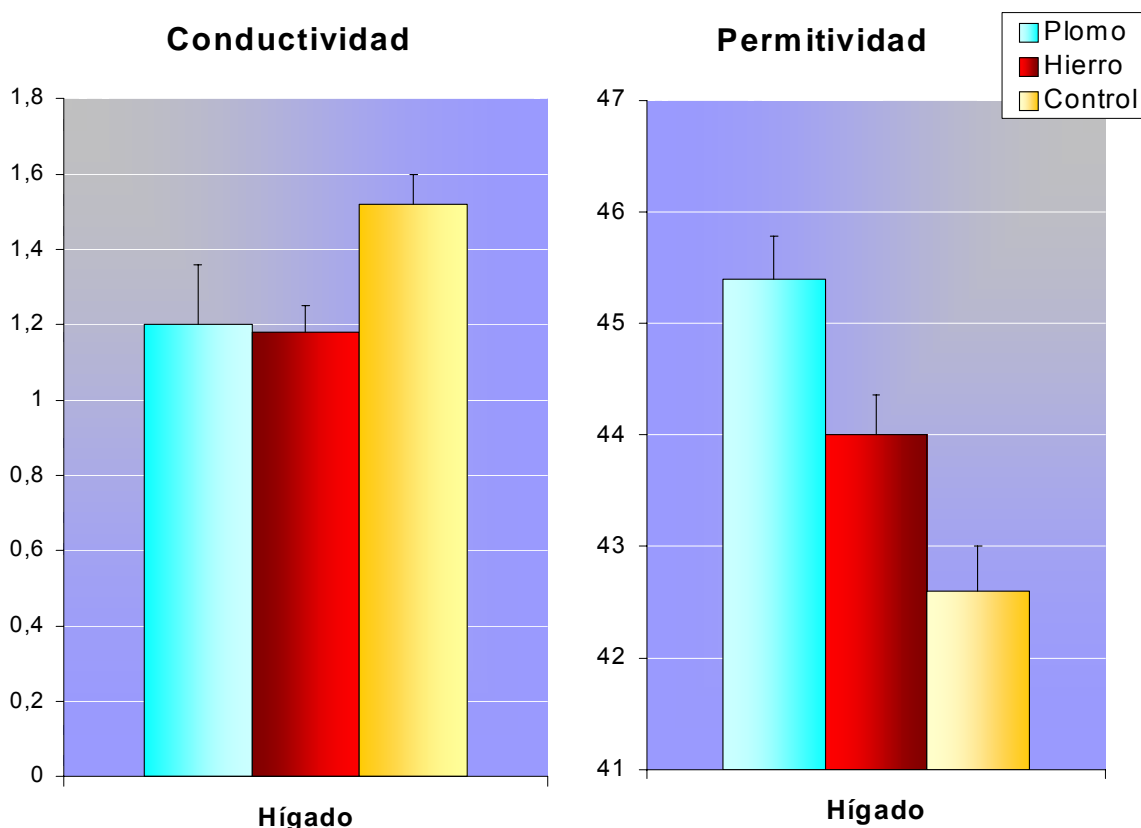


Fig. 59.- Variación de las propiedades dieléctricas en tejido hepático de ratas tratadas con plomo y hierro, frente a tejido hepático del grupo control.

Tanto la conductividad como la permitividad del tejido se ven alteradas respecto a los tejidos del grupo control, como puede observarse en las gráficas, viéndose la conductividad disminuida prácticamente en el mismo rango, en los casos de sobrecarga orgánica de plomo y de hierro, resultando esta disminución estadísticamente significativa, con $p < 0,05$, al llevarse a cabo el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

En cuanto a la permitividad, se percibe en ella un aumento importante respecto a los valores control, que es más acusado en el caso de la intoxicación por plomo de los animales cuyo tejido se estudia. En ambos casos, tras el

tratamiento de los datos, estos cambios se establecieron como estadísticamente significativos, al ser $p < 0,05$.

- **Pulmón:**

En la figura 60 se recoge la representación gráfica de los valores obtenidos en la evaluación de los cambios en las propiedades dieléctricas de tejido pulmonar de los distintos grupos de estudio.

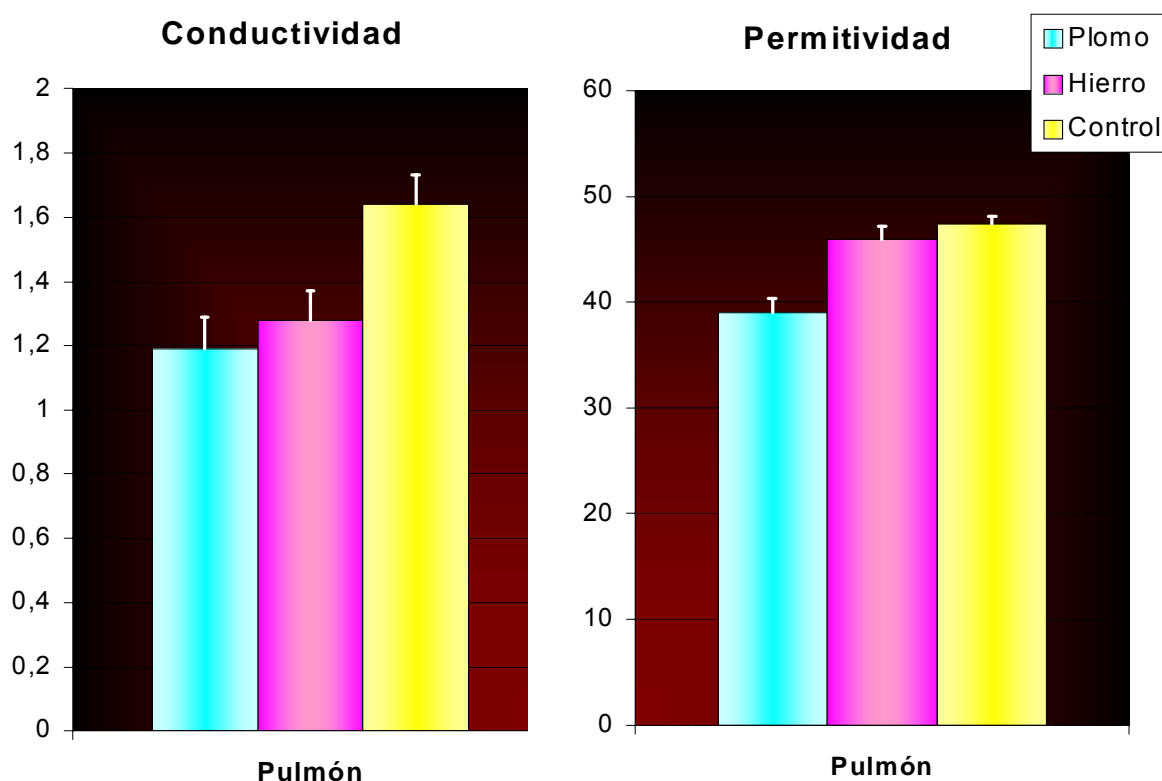


Fig. 60.- Variación de las propiedades dieléctricas en tejido pulmonar de ratas tratadas con plomo y hierro, frente a tejido pulmonar del grupo control.

Del análisis de la gráfica se concluye, como habíamos adelantado, que la disminución en la conductividad del tejido estudiado es estadísticamente significativa, tanto para los cambios provocados por dosis tóxicas de plomo, como

de hierro, aunque los efectos son más acusados en el caso de los tejidos de animales tratados con plomo.

La permitividad, a su vez, presenta una disminución estadísticamente significativa en los tejidos de ratas tratadas con plomo, con $p < 0,05$; no así el tejido pulmonar de los animales tratados con hierro, cuya permitividad no experimenta cambios dignos de mención.

- **Páncreas:**

Las variaciones observadas en las características eléctricas de tejido pancreático mediante irradiación con radiofrecuencia, en cuanto a los grupos de animales estudiados, se plasman en la gráfica de la figura 61.

En ella se aprecia la disminución que en la conductividad provoca una sobrecarga de hierro en el organismo y que constituye un cambio estadísticamente significativo, con $p < 0,05$. La intoxicación plúmbica, igualmente, provoca en este tejido cambios con significación estadística, al resultar $p < 0,05$ tras el análisis de los datos.

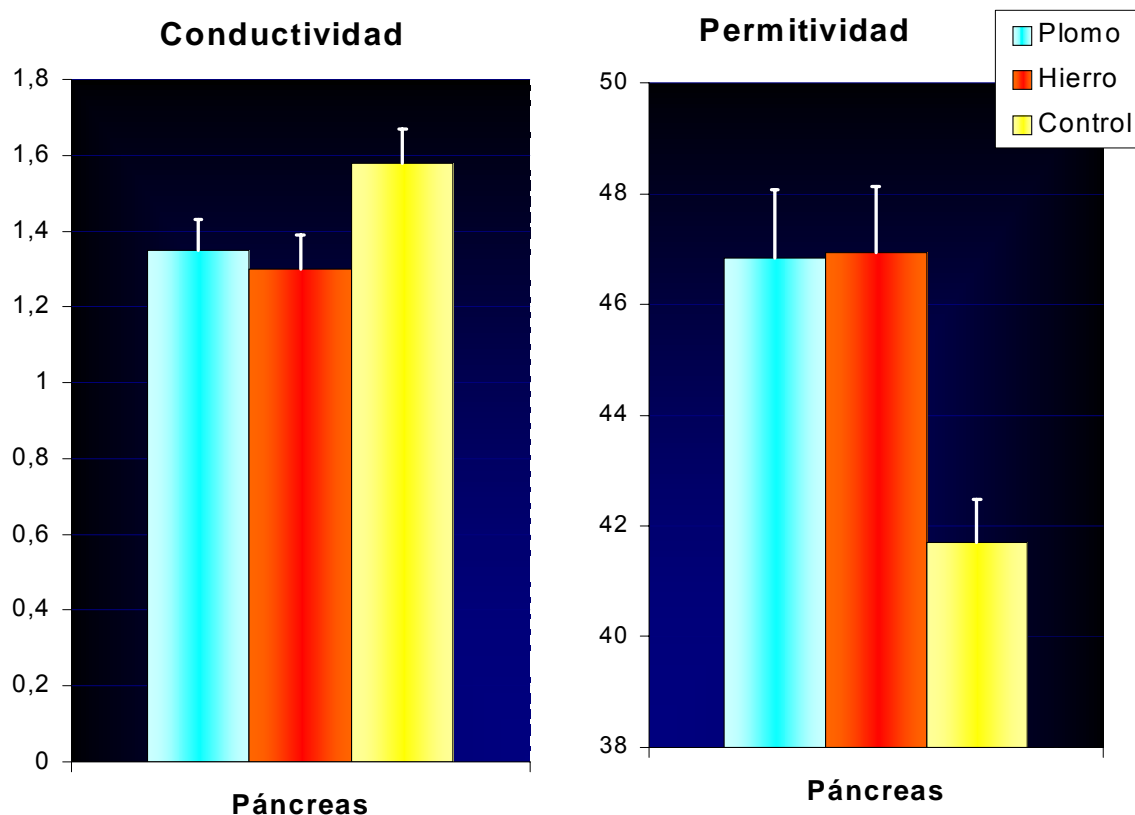


Fig. 61.- Variación de las propiedades dieléctricas en tejido pancreático de ratas tratadas con plomo y hierro, frente a tejido pancreático del grupo control.

La permitividad de este tejido, a su vez, aumenta considerablemente en ambos tipos de tratamiento metálico respecto a los valores proporcionados por los tejidos de las ratas control, resultando este aumento similar en ambos casos y estadísticamente significativo, con $p < 0,05$.

- **Músculo:**

El estudio gráfico de las variaciones que los dos tratamientos con metales provocan en las propiedades dieléctricas de tejido muscular se muestra en la figura 62.

RESULTADOS

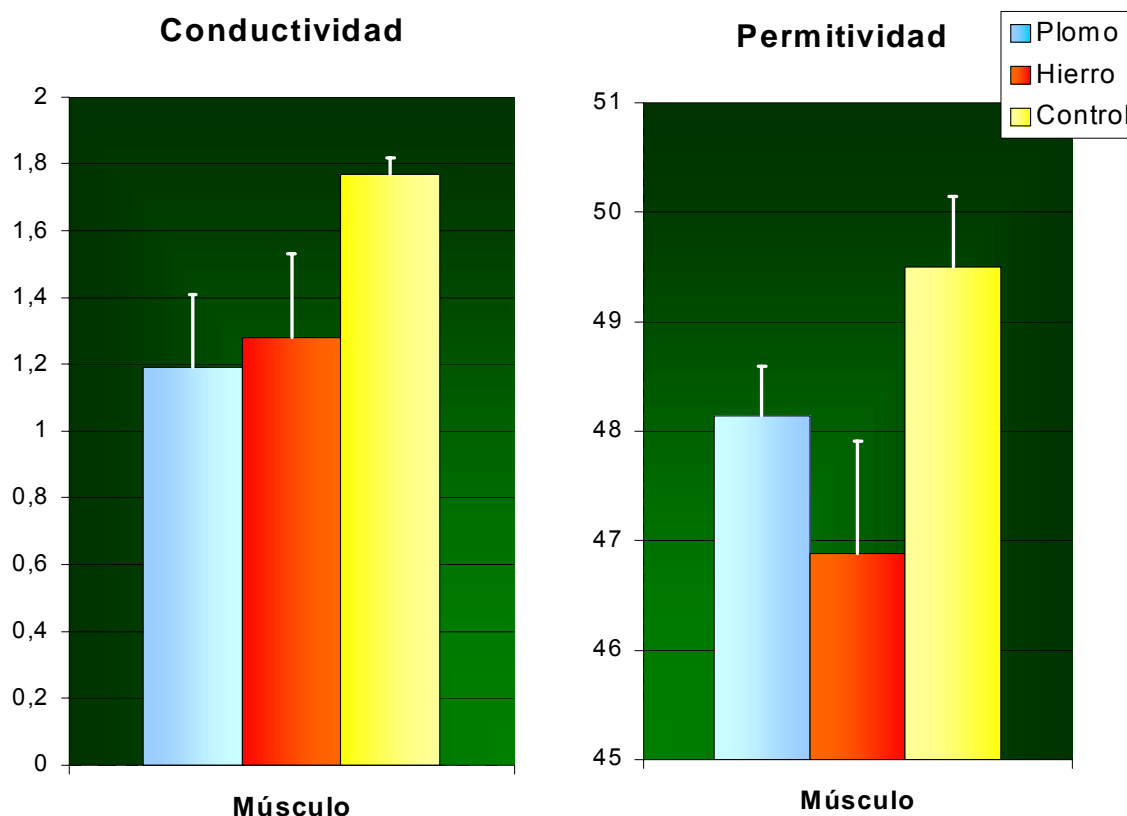


Fig. 62.- Variación de las propiedades dieléctricas en tejido muscular de ratas tratadas con plomo y hierro, frente a tejido muscular del grupo control.

El tejido muscular, en lo que respecta a su conductividad, se ve alterado por igual a causa de la sobrecarga orgánica de hierro y de plomo, dándose en ambos casos una disminución de esta propiedad eléctrica respecto a los valores normales que representan los tejidos del grupo control, reducción que, tras el oportuno análisis estadístico resulta ser, para ambos grupos de estudio, estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Asimismo se concluye, del estudio de los datos que dan lugar a la gráfica, que el descenso que se observa en la permitividad del tejido estudiado resulta ser estadísticamente significativo en ambos casos, con $p < 0,05$, aunque el efecto es más acusado en el caso del tejido extraído de los animales tratados con Fe.

- **Riñón:**

Por último, ofrecemos la gráfica resultante del estudio comparativo de las propiedades dieléctricas de tejido renal de sujetos a los que se administraron dosis tóxicas de hierro y plomo, y que aparece en la figura 63.

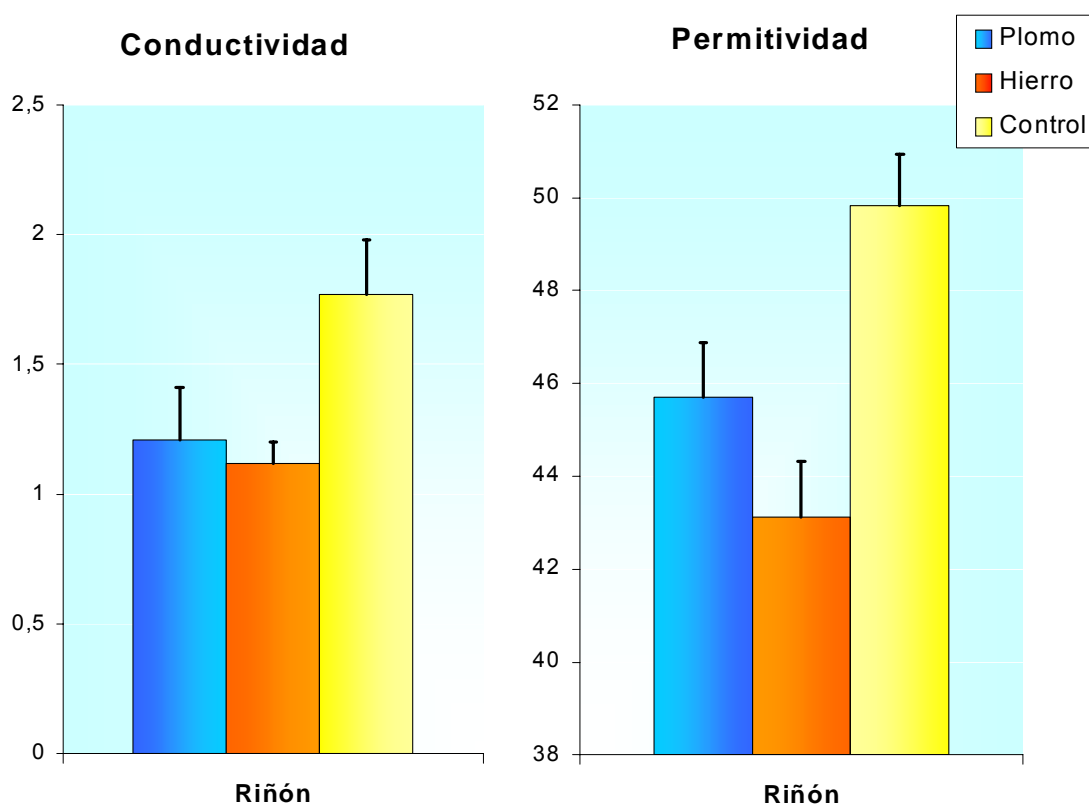


Fig. 63.- Variación de las propiedades dieléctricas en tejido renal de ratas tratadas con plomo y hierro, frente a tejido renal del grupo control.

RESULTADOS

La conductividad del tejido renal, como revela la gráfica correspondiente, resulta menor en los órganos obtenidos de ratas tratadas con metales que en los de aquellas sin tratamiento alguno y que constituyeron el grupo control; esta disminución, ligeramente más acusada en el grupo tratado con hierro, se estableció como estadísticamente significativa tras el análisis estadístico de los datos, al ser $p < 0,05$ en ambos casos.

Por su parte, la permitividad de los tejidos renales estudiados aparece asimismo mermada en los tejidos pertenecientes a aquellos grupos a los que fueron administradas altas dosis de metal, al ser comparada con los valores que arrojan los tejidos de las ratas del grupo control. Este descenso en la permitividad es mayor en el caso de órganos con sobrecarga orgánica de hierro, aunque tanto en éstos como en los tejidos de animales tratados con plomo, las diferencias resultaron estadísticamente significativas al ser comparadas con los valores normales, resultando $p < 0,05$.

V.- DISCUSIÓN.

En el momento de la exposición de los estudios realizados como objeto de la presente tesis doctoral, así como en la de los resultados por ellos aportados, hemos procurado, junto a cada uno de los planteamientos experimentales examinados, indicar el signo a que responde, así como la significación estadística que el análisis de los datos confiere a los resultados, si bien no hemos entrado en la consideración que dichos resultados nos merecen, constituyendo esta discusión la materia del presente capítulo.

Dada la amplitud de nuestro estudio y los diversos ensayos realizados en campos heterogéneos, consideramos oportuno pasar a la discusión de los resultados obtenidos en cada uno de ellos, antes de emitir las conclusiones a que dichos datos nos conducen en respuesta a los objetivos iniciales planteados.

V.1.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS *IN VITRO*.

V.1.1.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) en sistemas celulares y su posible sinergismo con plomo y hierro.

El cáncer y las enfermedades degenerativas, entre otros procesos patológicos, tienen en común ciertas alteraciones en la bioquímica celular que conducen a su vez a modificaciones en procesos celulares básicos. Hoy en día se sabe que esta etapa inicial de daño celular y molecular constituye un paso imprescindible para que la patología siga adelante, así como que puede preceder en años a la manifestación de la enfermedad propiamente dicha. Por consiguiente, se puede afirmar que un agente físico o químico no puede producir una cierta enfermedad si no es capaz de dañar al menos uno de los procesos celulares básicos de todo organismo vivo alterando sus mecanismos de control.

Así pues, para que los campos electromagnéticos de baja frecuencia (frecuencia, como ya se ha indicado, que pueden generar las instalaciones y equipos eléctricos de alta tensión, o frecuencia industrial) sean considerados como agentes peligrosos para la salud, es necesario demostrar que son capaces de producir alguna alteración funcional o estructural a nivel celular y molecular. Este, precisamente, era el fin perseguido en la primera parte de nuestro estudio: establecer las posibles alteraciones ocasionadas por los campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) en mecanismos celulares y moleculares tan básicos como la proliferación celular.

Una célula es más vulnerable a cualquier agente externo cuando está más activa, es decir, cuando se está duplicando o cuando está leyendo su material genético. Por tanto, los experimentos *in vitro* con células

estimuladas con una señal de proliferación específica (en nuestro caso, la fitohemaglutinina-M) y expuestas a un agente, son el camino más sencillo y rápido para que éste revele sus posibles efectos biológicos. Las células se dividen cuándo y dónde conviene, de acuerdo a las necesidades generales del organismo, e importantes procesos patológicos están ligados a trastornos en la proliferación celular por exceso o por defecto: el cáncer, por ejemplo, como es bien sabido, se inicia a partir de una célula que crece continuamente y sin control.

Por otra parte, tanto el funcionamiento como la morfología de la célula son el resultado de la expresión de un conjunto de genes, cuya alteración o mutación causa trastornos en el comportamiento celular; este hecho incuestionable fundamenta la necesidad de realizar ensayos encaminados a determinar si el agente estudiado produce o no alteraciones en el material genético de las células.

Así, y en base a lo anteriormente expuesto, se llevaron a la práctica los ensayos pertinentes, según se describió en el capítulo III de la presente tesis doctoral, a fin de determinar los efectos de un campo magnético de 50 Hz en la proliferación celular de linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, sometidos a distintas intensidades de campo (32, 64 y 96 G, que corresponden a 3,2, 6,4 y 9,6 mT, respectivamente), estableciendo posteriormente, si es que existiera, el daño genético en los cultivos celulares sometidos a la acción del campo apuntado. Todo ello simultaneado con el

estudio de la posible potenciación del efecto tóxico ocasionado por incubación de las células con sobrecarga de plomo y hierro, en presencia del campo magnético objeto del estudio, determinando posibles sinergismos de estos metales con la radiación indicada, de frecuencia extremadamente baja, a distintas intensidades de campo.

V.1.1.a.- *Efectos del campo magnético de 50 Hz sobre la proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo.*

Pues bien, a la hora de emitir un juicio a la vista de los resultados obtenidos en los experimentos realizados *in vitro* sobre sistemas celulares aislados, tras la aplicación de un campo magnético de 50 Hz a tres intensidades diferentes de campo, se ha llevado a cabo un análisis de los datos, como ya dijimos, en función de los objetivos establecidos al inicio del estudio.

Dicho análisis de los valores emanados por las repeticiones de los ensayos encaminados a determinar variaciones en la proliferación celular con el tratamiento descrito, tal y como se expuso en su momento en el capítulo de *Resultados*, nos lleva a afirmar que, en las condiciones de nuestro experimento, los campos magnéticos de la frecuencia descrita y a las intensidades de campo de 3,2 y 6,4 mT, no tienen efecto alguno sobre el crecimiento de linfocitos de sangre periférica humana, a pesar de una tendencia evidente de las células

cultivadas en presencia de estas radiaciones a un mayor crecimiento, pero que no llega en ningún caso a tener significación estadística. Estos resultados vienen a confirmar los obtenidos recientemente por otros laboratorios en varios estudios sobre la materia,²⁴⁸ así como los que, en este sentido, numerosos equipos de investigación han ido desarrollando en las últimas décadas, y en los que no se describen, en distintos tipos celulares, cambios en la proliferación celular²⁴⁹ de cultivos expuestos a la acción de campos magnéticos.

No podemos, sin embargo, dejar de mencionar otros tantos trabajos

²⁴⁸ Por citar algún ejemplo, traeremos a colación el estudio de Paile, W.; Jokela, K.; Koivistoinen, A. y Salomaa, S., "Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields and spark discharges on human lymphocytes in vitro", *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 36, 1995: 15-22; el de Thumm, S.; Loschinger, M.; Glock, S.; Hammerle, H. y Rodemann, H.P., "Induction of cAMP-dependent protein kinase A activity in human skin fibroblasts and rat osteoblasts by extremely low-frequency electromagnetic fields", *Radiat. Environ. Biophys.*, 38(3), Septiembre, 1999: 195-199; o el del equipo de Aaron, R.K.; Ciombor, D.M.; Keeping, H.; Wang, S.; Capuano, A. y Polk, C., "Power frequency fields promote cell differentiation coincident with an increase in transforming growth factor-beta(1) expression", *Bioelectromagnetics*, 20(7), Octubre, 1999: 453-458, que observan que no existen cambios en la proliferación ni en el contenido celular de los cultivos estudiados. En el mismo sentido concluye el trabajo de Simko, M.; Dopp, E. y Kriehuber, R., "Absence of synergistic effects on micronucleus formation after exposure to electromagnetic fields and asbestos fibres in vitro", *Toxicol. Lett.*, 108(1), Julio, 1999: 47-53, así como la revisión de Brent, R.L., "Reproductive and teratologic effects of low frequency electromagnetic fields: a review of in vivo and in vitro studies using animal models", *Teratology*, 59(4), Abril, 1999: 261-286.

²⁴⁹ Así, por ejemplo, el trabajo de nuestro equipo, García Arribas, O.; Pérez Calvo, M.; Nuñez García, M.; Sebastián, J.L.; Martínez, G.; Rodríguez, L.P. und Ribas Ozonas, B., "Proliferation und Mikronucleus in peripheren menschlichen Lymphocyten in Gegenwart von Kadmium im ELF-Magnetfeld", *Mengen und Spurenelemente*, 1, en: M. Anke, W. Arnhold, et al. (eds.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, Alemania, 1998: 9-16; el de Desjobert, H.; Hillion, J.; Adolphe, M.; Averiant, G y Nafziger, J., "Effects of 50 Hz magnetic fields on C-myc transcript levels in nonsynchronized and synchronized human cells", *Bioelectromagnetics*, 16(5), 1995: 277-283; o el estudio sobre fibroblastos de Cridland, N.A., *Electromagnetic fields and cancer: A review of relevant cellular studies*. Report of the National Radiological Protection Board, United Kingdom, NRPB-R256, 1993; sobre fibroblastos versa, asimismo, el de Nakajima, H.; Kishi, T.; Tsuchiya, Y.; Yamada, H. y Tajima, S., "Exposure of fibroblasts derived from keloid patients to low energy electromagnetic fields: preferential inhibition of cell proliferation, collagen synthesis and transforming growth factor beta expression in keloid fibroblasts in vitro", *Ann. Plast. Surg.*, 39(5), Noviembre, 1997: 536-541, que concluye que no existen efectos sobre la proliferación de fibroblastos normales.

que rebaten estos resultados al describir alteraciones, en la proliferación de distintos tipos celulares, por parte de los campos electromagnéticos de baja frecuencia,²⁵⁰ si bien es cierto que muchos de ellos no se basan en investigaciones sobre células normales, sino que estudian células cancerígenas o alteradas por algún agente ajeno a ellas.²⁵¹ En los mencionados trabajos de investigación se describen, tanto casos de inhibición como de aumento de la proliferación celular, dependiendo de las condiciones y sujetos del estudio, concluyéndose en alguno de ellos simplemente que los campos electromagnéticos de baja frecuencia modulan en cierta medida la proliferación así como la diferenciación celular, aunque no llegan a determinar en qué manera.

Por otra parte, y volviendo a nuestros resultados, las variaciones observadas en el crecimiento de los linfocitos sometidos a la acción del campo magnético de 50 Hz y 9,6 mT de intensidad, en el sentido de

²⁵⁰ Cossarizza, A.; Monti, D.; Bersani, F.; Cantini, M.; Cadossi, R.; Sacchi, A. y Franceschi, C., "Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160(2), Abril, 1989: 692-698.

²⁵¹ Es el caso del anteriormente mencionado estudio de Nakajima, H et al., "Exposure of fibroblasts...", op. cit., 536-541, sobre fibroblastos, o el de Landry, P.S.; Sadasivan, K.K.; Marino, A.A. y Albright, J.A., "Electromagnetic fields can affect osteogenesis by increasing the rate of differentiation", *Clin. Orthop.*, 338, Mayo, 1997: 262-270, que describe un aumento en la proliferación de osteoblastos en presencia de CEM únicamente tras una herida. Asimismo, para ilustrar el caso de estudios realizados a partir de líneas celulares cancerígenas, citar el trabajo de Sollazo, V.; Traina, G.C.; DeMattei, M.; Pellati, A.; Pezzetti, F y Caruso, A., "Responses of human MG-63 osteosarcoma cell line and human osteoblast-like cells to pulsed electromagnetic fields", *Bioelectromagnetics*, 18(8), 1997: 541-547; el estudio de Watson, J.M.; Parrish, E.A. y Rinehart, C.A., "Selective potentiation of gynaecologic cancer cell growth in vitro by electromagnetic fields", *Gynecol. Oncol.*, 71(1), Octubre, 1998: 64-71; o el más reciente de Chen, G.; Upham, B.L.; Sun, W.; Chang, C.C.; Rithwell, E.J.; Chen, K.M.; Yamasaki, H. y Trosko, J.E., "Effect of electromagnetic field exposures on chemically induced differentiation of friend erytroleukemia cells", *Environ. Health. Perspect.*, 108, Octubre, 2000: 967-972.

una disminución estadísticamente significativa de la proliferación, no deben tenerse en cuenta al tratarse de cambios imputables, con toda certeza, a un efecto térmico probado, es decir, a un aumento de la temperatura de incubación por encima de los 37°C debido al diseño de la cámara que, como se recordará, presentaba un valor máximo de corriente admisible por el auto-transformador de 1 A, que corresponde a un campo magnético de intensidad 6,4 mT.

A pesar de esta limitación en el diseño de la cámara, y a modo de prueba, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* a mayor intensidad a fin de determinar las consecuencias de ello derivadas, y que son las que acabamos de manifestar.

En lo que concierne a la parte del ensayo dirigida a determinar un posible sinergismo entre el campo magnético estudiado y los efectos tóxicos de plomo y de hierro, se concluye que tal sinergismo, en las condiciones descritas en la exposición de nuestro experimento, no existe. Evidentemente, y como demuestran los resultados del ensayo en lo tocante a proliferación celular, al resultar ambos metales citotóxicos, los cultivos incubados con elevadas concentraciones de los mismos muestran un menor crecimiento que los controles (recordemos que los resultados evidenciaban una disminución estadísticamente significativa de la proliferación celular para concentraciones del orden de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M, tanto en el caso del hierro como del plomo, tal y

como se indicó en el apartado correspondiente del capítulo IV del presente trabajo), y si bien es cierto que en los cultivos así incubados y sometidos además a la acción del campo magnético se observa un mayor crecimiento, éste constituye tan sólo una tendencia sin significación estadística, como ya se afirmó en el momento de la exposición de resultados. No obstante esta falta de significación estadística, no sería atinado hacer caso omiso de la mencionada tendencia, ya que podría ser indicadora de la potenciación del efecto citotóxico de ciertos agentes en casos de exposiciones a campos electromagnéticos bajo condiciones distintas a las de nuestro estudio (exposiciones crónicas, intensidades de campo diferentes a las del ensayo, células especialmente sensibles, etc.).

Mención especial merece el caso del hierro, ya que fue elegido para nuestra investigación principalmente por sus propiedades ferromagnéticas, a pesar de que, como ya se indicó, el ferromagnetismo es una propiedad que depende de la estructura cristalina propia de los sólidos, no existiendo ningún átomo que sea ferromagnético aisladamente. Esto implica que las soluciones que contienen iones de hierro tampoco son ferromagnéticas;²⁵² no obstante, el ión seguía resultando interesante para nuestro trabajo al presentar

²⁵² A pesar de que los tejidos del cuerpo no poseen propiedades ferromagnéticas, ciertas partículas con estas propiedades pueden encontrarse presentes en pulmón y otros órganos como contaminantes (Valberg, P.A. y Butler, J.P., "Magnetic particle motions within living cells. Physical theory and techniques", *Biophys. J.*, 52(4), Octubre, 1987: 537-550).

los complejos moleculares con hierro propiedades paramagnéticas.

De cualquier manera, podemos aseverar que, en las condiciones del ensayo, estas conocidas propiedades del hierro no han tenido ninguna influencia en términos de proliferación celular para los linfocitos sometidos a su acción, aparte de la previsible inhibición del crecimiento a que ya nos hemos referido a altas concentraciones del metal (inhibición esta, como se ha señalado, que se observa igualmente en el caso del plomo, metal que no presenta las propiedades paramagnéticas apuntadas para el hierro, ya que es sabido que, a altas concentraciones, los iones metálicos pueden producir, en su transporte al interior de la célula, rotura de la membrana celular, provocando así una pérdida de su regulación homeostática, trastorno grave del metabolismo energético y muerte celular). La mencionada inhibición en el crecimiento celular es, asimismo, imputable a la liberación de especies reactivas de oxígeno en el metabolismo del hierro. De hecho, al encontrarse éste en exceso y, por tanto, disponible para captar electrones, participa en la generación de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton que él mismo cataliza, y que resulta uno de los más interesantes mecanismos tóxicos por exceso del metal.

Lo mismo se puede afirmar en lo que respecta a la toxicidad del plomo en el caso que nos ocupa, es decir, en cuanto a proliferación celular se refiere, ya que en dicha toxicidad se halla de igual manera

implicado el estrés oxidativo, al provocar el metal la formación de radicales hidroxilo.²⁵³

En ambos casos, con sobrecarga de hierro o de plomo, la inhibición que se constata en el crecimiento de los linfocitos, obedece principalmente a los radicales libres por ellos generados,²⁵⁴ capaces de inducir la peroxidación lipídica,²⁵⁵ lo que resulta en daños en las membranas celulares, mitocondriales y lisosomales, alterando la fluidez de las mismas y originando cambios en sus potenciales, que ven de esta manera incrementada su permeabilidad.

V.1.1.b.- *Efectos del campo magnético de 50 Hz sobre el material genético de linfocitos humanos en cultivo.*

Como indicábamos anteriormente, además del estudio de mecanismos celulares básicos como la proliferación, nuestro trabajo, en su primera fase de ensayos *in vitro*, incluye la comprobación de las alteraciones que los campos electromagnéticos de baja frecuencia

²⁵³ Gurer, H. et al., "Antioxidant role...", op. cit., 75- 81; El-Missiry, M.A., "Prophylactic effect of...", op. cit., 57- 62; Adonaylo, V.N. y Oteiza, P.I., "Lead intoxication: antioxidant defences...", op. cit., 77- 85.

²⁵⁴ Gurer, H. et al., "Antioxidant role...", op. cit., 75- 81; El-Missiry, M.A., "Prophylactic effect of...", op. cit., 57- 62; Adonaylo, V.N. y Oteiza, P.I., "Lead intoxication: antioxidant defences...", op. cit., 77- 85; Gutteridge, J.M.C. et al., "Superoxide- dependent formation of hydroxyl radicals...", op. cit., 263- 265; Hamoutene, D. et al., "Iron ore mines...", op. cit., 218-224; Acworth, I.N. y Baily, B.B., *The Handbook of oxidative metabolism*, op. cit., 12- 17.

²⁵⁵ Schubert, D. y Chevion, M., "The role of iron ...", op. cit., 702- 707; Clothier, B. et al., "Genetic variation of basal...", op. cit., 115-122.

pueden provocar en la estructura del material hereditario de la célula, el ADN.

Esto es de especial importancia, ya que si se estableciera que efectivamente este tipo de radiación puede dar lugar a tales modificaciones, sería razonable suponer que puede asimismo, en consecuencia, producir mutaciones, malformaciones y transformaciones cancerígenas.

Por tanto, se llevaron a cabo los experimentos encaminados a determinar daño genético en presencia y ausencia de un campo magnético de 50 Hz y distintas intensidades (3,2, 6,4 y 9,6 mT) en linfocitos humanos de sangre periférica, empleando para ello la técnica homologada de micronúcleos con bloqueo citogenético (BC), tal y como se describió en el correspondiente epígrafe del capítulo III de la presente tesis doctoral.

Recordemos que allí señalamos cómo, entre los métodos biológicos adoptados para determinar los daños causados por las radiaciones, el análisis citogenético es el más conocido. De tal manera que la presencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica se ha utilizado desde hace aproximadamente veinticinco años como indicador biológico sensible y fiable para radiaciones, principalmente ionizantes.

A su vez, e incluido dentro de estas técnicas, el ensayo de los micronúcleos se basa en la aparición de pequeños núcleos abortivos que se observan después de la fragmentación de cromosomas (clastogenicidad) o tras la exposición de células a tóxicos. Estos micronúcleos, que representan una expresión del daño genético, son fácilmente identificables, incluso a pequeños aumentos y requieren una sola división celular para expresarse.

Los resultados de este estudio, como ya se vio en su momento, no reflejan un aumento de micronúcleos estadísticamente significativo en los cultivos sometidos a la acción del campo magnético respecto a los grupos control, siendo la aparición de dichos marcadores en los grupos tratados, aproximadamente igual a la frecuencia espontánea de estos en las células sin tratamiento.²⁵⁶ Decimos que la aparición de micronúcleos es *aproximadamente* igual en los cultivos expuestos que en los no expuestos porque las diferencias, como ya manifestamos, no llegan a tener significación estadística; sin embargo, al igual que en el caso de los estudios sobre proliferación celular, sí se perfila una

²⁵⁶ Dichos resultados son plenamente coincidentes con los de estudios llevados a cabo en los últimos años por distintos laboratorios que, al igual que nosotros, no encuentran diferencias significativas en la aparición de micronúcleos, en distintos tipos celulares, entre las sometidas a la acción de CEM y las control. Es el caso, por citar un ejemplo en el que se trabaja en las mismas condiciones de nuestro estudio, del estudio de Scarfi, M.R.; Versan, F.; Cossarizza, A.; Monti, D.; Castellani, G.; Cadossi, R.; Franceschetti, G. Y Franceschi, C., "Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed magnetic fields", *Biochem. Biophys. Res. Común.*, 176(1), Abril, 1991: 194-200, o el más reciente del mismo equipo: Scarfi, M.R.; Bersani, F.; Cossarizza, A.; Monti, D.; Zeni, O.; Lioi, M.B.; Franceschetti, G.; Capri, M. y Franceschi, C., "50 Hz AC sinusoidal electric fields do not exert genotoxic effects (micronucleus formation) in human lymphocytes", *Radiat. Res.*, 135(1), Julio, 1993: 64-68; tampoco se describen cambios en la aparición de micronúcleos en el ya mencionado estudio de Paile, W et al., "Effects of 50 Hz sinusoidal...", op. cit., 15-22.

tendencia a un ligero aumento del número de micronúcleos en los cultivos sometidos al campo magnético respecto a los cultivos control.

Al igual que al hablar del sesgo que la acción del campo magnético estudiado provocaba en la proliferación celular manifestábamos que dicha propensión podría tener trascendencia biológica, a pesar de no constituir una diferencia apreciable en términos estadísticos, al constatar ahora una tendencia parecida en la aparición de micronúcleos, nos parece importante subrayar de nuevo este hecho, que podría, en circunstancias diferentes a las de nuestro ensayo, ser más acusado.²⁵⁷

De cualquier manera, esta consideración no deja de ser una mera hipótesis, mientras que lo que sí nos encontramos en condiciones de afirmar fehacientemente en base a los resultados obtenidos en los experimentos de genotoxicidad, es que los campos magnéticos estudiados no pueden calificarse de genotóxicos en las condiciones impuestas por nuestro ensayo, al no provocar roturas en el ADN de las células a él sometidas en grado detectable.

²⁵⁷ Así ocurre, por ejemplo, en el estudio ya citado de Simko, M. et al, "Absence of synergistic...", op. cit., 47-53, en el que se describe un aumento de MN en los cultivos sometidos a la acción del CM, que no afecta no obstante la proliferación celular, como señalamos al hablar de ésta, o en el trabajo de Valjus, J.; Norppa, H.; Jarventaus, H.; Sorsa, M.; Inquirí, E.; Salomaa, S.; Jarvinen, P. y Kajander, J., "Analysis of chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei among power linesmen with long-term exposure to 50-Hz electromagnetic fields", *Radiat. Environ. Biophys.*, 32(4), 1993: 325-336, en el que se describe asimismo un aumento de daño genético, aunque señalan que los resultados podrían estar influidos por el hecho de ser algunos de los sujetos del estudio fumadores.

Tal afirmación no resulta sorprendente a la luz de recientes estudios²⁵⁸ realizados en materia de medida de energías celulares y moleculares, en los que éstas se comparan con las que presentan los campos magnéticos de baja frecuencia capaces de llegar al medio en que se encuentran las células.

Precisamente, las magnitudes de fuerzas endógenas que actúan a nivel celular para modificar estructura proteicas son, en gran medida, conocidas y pueden servir por tanto de término comparativo a la hora de determinar las fuerzas que puede llegar a generar un campo electromagnético exógeno. Efectivamente, se conoce la magnitud de fuerzas moleculares generadas en células vivas, y que van desde 1 piconewton (pN) en el caso de las células de activación en el oído interno (base de la sensación auditiva),²⁵⁹ a los 70 pN de los enlaces del ADN (derivados de la replicación del ADN).²⁶⁰

Resulta factible, por tanto, utilizando las leyes físicas de la electricidad y el magnetismo, establecer una comparación entre estos valores y la magnitud de las fuerzas que llegarían a ejercer sobre

²⁵⁸ Valberg, P.A., "How do endogenous forces in cells compare to forces and torques caused in cells by external electric and magnetic fields?", en AAVV, *Radiat. Res.*, vol.2: Proceedings, Dublín, Irlanda, 18-23 de Julio, 1999: 219-221.

²⁵⁹ Denk, W.; Holt, J.R.; Shepherd, G.M.G. y Corey, D.P., "Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links", *Neuron.*, 15(6), Diciembre, 1995: 1311-1321.

²⁶⁰ Lee, G.U.; Chirisey, L.A. y Colton, R.J., "Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA", *Science*, 266(5186), Noviembre, 1994: 771-773.

moléculas e iones niveles moderadamente altos de campos electromagnéticos de 50 Hz.

Así, se ha llegado a determinar que la energía eléctrica que transporta cualquier campo electromagnético resulta atenuada en el interior del medio conductivo que supone el cuerpo, de manera que en el medio lipídico de la membrana celular, la energía de dicho campo queda reducida a niveles muy inferiores a los de partida. De hecho, en estos casos, la fuerza del campo eléctrico inducido resulta, con mucho, menor que las fuerzas a las que habitualmente se encuentra sometida la célula, siendo incluso inferiores a las fuerzas que se sabe son capaces de modificar las funciones de las moléculas proteicas. En efecto, serían necesarias fuerzas del orden de 0'2 pN como mínimo para alcanzar efectividad biológica, y para conseguir dicho nivel sería necesario un campo electromagnético exógeno de 200.000 Hz y 3 μ T.²⁶¹

Por lo tanto, como decíamos, los resultados arrojados por nuestro trabajo son coherentes con los hechos expuestos, resultando lógico comprobar que el campo magnético investigado, a pesar de las intensidades extremas aplicadas (muy por encima de las presentes en la vida real), no afecta al material genético de las células estudiadas, ya

²⁶¹ Valberg, P.A.; Kavet, R. y Rafferty, C.N., "Can Low-Level 50/60 Hz Electric and Magnetic Fields Cause Biological Effects?", *Radiat. Res.*, 148, 1997: 2-21.

que los enlaces del ADN resultan ser los que comportan fuerzas mayores, a los efectos de una mayor resistencia, dada la importancia de la integridad de la molécula y los problemas que su rotura implican.

Obviamente, todo lo anterior no resulta válido en lo tocante al posible sinergismo entre el campo magnético aplicado y la toxicidad de los metales elegidos, ya que tanto el plomo como el hierro provocan daño genético, no tanto por su acción directa sobre el ADN como por su ya mencionada capacidad de generar especies reactivas del oxígeno,²⁶² que además de causar daños en el material genético, son capaces asimismo de alterar el sistema celular antioxidante de defensa. Ello explica que a altas concentraciones de metal (de 10^{-4} y 10^{-5} M en ambos casos, como ya se expuso en el apartado correspondiente del capítulo anterior) las diferencias en la frecuencia de aparición de micronúcleos respecto a los grupos control resulten estadísticamente significativas.

No obstante lo dicho, no se llega a establecer en absoluto ningún tipo de sinergismo, en cuanto a la aparición de micronúcleos, entre el efecto tóxico de los mencionados metales y el efecto del campo magnético aplicado, aunque una vez más debemos recalcar la

²⁶² Gurer, H. et al., "Antioxidant role...", op. cit., 75- 81; El-Missiry, M.A., "Prophylactic effect of...", op. cit., 57- 62; Adonaylo, V.N. y Oteiza, P.I., "Lead intoxication: antioxidant defences...", op. cit., 77- 85; Gutteridge, J.M.C. et al, "Superoxide- dependent formation of hydroxyl radicals...", op. cit., 263- 265; Hamoutene, D. et al., "Iron ore mines...", op. cit., 218-224; Acworth, I.N. y Baily, B.B., *The Handbook of oxidative metabolism*, op. cit., 12-17.

tendencia al aumento en el número de micronúcleos que se advierte en el caso de los cultivos tratados con metales y sometidos, además, a la acción del campo magnético, respecto a aquellos incubados en ausencia de dicho campo; tendencia que en ningún caso llega a presentar significación estadística, pero que, no obstante, no queremos pasar por alto.

V.1.2.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio del efecto de campos magnéticos de baja frecuencia (50 Hz) sobre tejido sanguíneo humano.

Una vez establecidos los efectos biológicos de un determinado agente supuestamente tóxico en los sistemas más sencillos, es decir, en cultivos de células aisladas, ha de comprobarse si dichos efectos se reproducen en tejidos completos, que son menos vulnerables a la acción de agentes externos, para saber hasta qué punto son extrapolables las conclusiones obtenidas a tejidos completos, finalizando de esta manera los estudios *in vitro* que dan paso a aquellos realizados con animales adultos.

Consecuentemente, a fin de comprobar si los campos magnéticos de 50 Hz a intensidades elevadas son capaces de producir alguna alteración funcional o estructural a nivel celular y molecular en la composición de tejido sanguíneo humano, los siguientes ensayos *in vitro* se encaminaron a la

consecución de este objetivo llevándose a la práctica tal y como se precisó en el epígrafe correspondiente del capítulo III de la presente tesis doctoral.

De esta manera, y a la luz de los resultados obtenidos en los citados ensayos, realizados sometiendo sangre humana a la acción del campo magnético estudiado, y a las intensidades de campo de 1,6, 3,2 y 6,4 mT, durante 6, 12, 24 y 48 horas, podemos afirmar que dicho campo magnético no presenta efecto alguno en la composición bioquímica o enzimática de la sangre a él expuesta.

Recordemos que el análisis estadístico de los datos obtenidos en los distintos experimentos no llegaba a establecer diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de sangre incubadas en presencia del campo magnético y las controles, en ninguno de los parámetros sometidos a estudio (los bioquímicos: albúmina, bilirrubina total, calcio sérico, fósforo, glucosa, hierro sérico, magnesio, urea y proteínas totales, y los enzimáticos: LDH, fosfatasa alcalina, CPK, GOT, GPT, y gamma-GT), resultando esta aseveración igual de cierta para cada una de las intensidades ensayadas y a todos los tiempos de incubación (6, 12, 24 y 48 horas) en cada caso.

Asimismo hemos de recapitular cómo, en la exposición de resultados correspondiente, precisamos que se presentaban allí las gráficas, resultantes del tratamiento estadístico de los valores obtenidos, de determinados parámetros que, al menos en apariencia, experimentaban una

tendencia a la variación, aunque ésta parecía ser independiente del tratamiento con campo magnético, respondiendo, más bien, dichas variaciones al tiempo transcurrido entre una y otra medida realizada.

Efectivamente, se aprecia un aumento importante en las concentraciones de fósforo y LDH transcurridas 24 horas, efecto que se acentúa a las 48 horas de incubación, y que en ambos casos resulta estadísticamente significativo al compararse con los niveles de referencia de estos dos parámetros presentes en suero normalmente.

Este fenómeno es completamente natural y previsible, ya que revela sencillamente el daño celular debido a la vida media de las células sanguíneas fuera del torrente circulatorio, daño que empieza a hacerse patente precisamente tras las 24 horas de incubación. Así, al hallarse la célula en condiciones adversas, las reacciones de equilibrio iónico se rompen, alterándose el potencial de membrana, por lo que iones que normalmente se encuentran en el interior de la célula comienzan a liberarse al medio, al transformarse la membrana de activa en semipermeable.

Esto es especialmente notable en el caso del fósforo, ión presente en la mayor parte de las estructuras celulares y que se va liberando de ellas al hacerse patente el daño celular, procedente principalmente de los fosfolípidos de membrana. De esta manera se explica fácilmente el importante aumento de este ión, observado en todos los casos, a partir de

transcurridas 24 horas, por igual en las muestras expuestas y en los controles no sometidos a la acción del campo magnético, según señalamos con anterioridad. Por otra parte, el fósforo inorgánico que detecta el método utilizado por el analizador de Química Clínica con el que se llevaron a cabo los análisis de los sueros estudiados, presenta una estabilidad en suero, a 20- 25°C, de dos días, por lo que en los tiempos a los que se realizaron las medidas no hay aún pérdida del mencionado ión, cuya concentración es, por tanto, detectada por completo a las 24 y 48 horas.

Lo manifestado para el fósforo es igualmente válido en lo que respecta a la enzima lactato deshidrogenasa, LDH, ya que, de la misma manera, su aumento en suero constituye un factor de lesión celular eritrocitaria, al tratarse de una enzima intracelular presente en cantidades considerables en el interior de los eritrocitos. Cuando estos sufren algún tipo de daño o desequilibrio –como es el caso que nos ocupa-, la LDH es liberada, con el consiguiente aumento de sus concentraciones en suero a que nos hemos referido con anterioridad, aumento que, de cualquier manera, no resulta estadísticamente significativo.

Es de recalcar, como ya hicimos al comentar los resultados obtenidos en la primera parte de los estudios *in vitro* con cultivos celulares, la tendencia que presentan las concentraciones de los dos parámetros en cuestión, el fósforo y la LDH, a un ligero aumento respecto a los controles en los casos de sueros sometidos a la acción del campo magnético descrito y a todas las

intensidades señaladas, a pesar de que, como apuntamos en los estudios celulares, este aumento carece de significación estadística.

No resulta, por otra parte, insólito el ligero aumento en las concentraciones de fósforo y LDH señalado, y que se observa en los sueros expuestos al campo magnético, si tenemos en cuenta que, como indicábamos al hablar de los efectos terapéuticos de los campos magnéticos de baja frecuencia, el efecto de magnetización que éstos inducen favorece los procesos de difusión a través de la membrana celular, al provocar un aumento en su permeabilidad. Dicho aumento, ocasionado por la acción del campo objeto del estudio, debe de sumarse al desmantelamiento general de los mecanismos celulares de equilibrio iónico imputable al tiempo transcurrido, lo que se traduce en ese ligero incremento, sin significación estadística, al que aludíamos en los casos de sangre incubada en la cámara generadora del campo magnético. No olvidemos, a este respecto, que los efectos que los campos magnéticos ejercen sobre las membranas biológicas en general, y sobre las eritrocitarias en particular, han sido estudiados exhaustivamente en las dos últimas décadas,²⁶³ por lo que es de sobra conocido el efecto apuntado de permeabilización de las mismas por parte de

²⁶³ Cherkasov, G.V., "State of erythrocytes after long-term exposure to magnetic field", *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.*, 17(5), Septiembre, 1983: 72-75; Loginov, V.A.; Timonin, I.M.; Minchenko, B.I. y Klimovitskii, V.I., "The permeability of rat erythrocyte membranes for sodium and potassium ions during exposure to pulsed electromagnetic field under head-down-tilt hypokinesia", *Aviakosm. Ekolog. Med.*, 26(5-6), Septiembre, 1992: 71-75; Traikov, L.L.; Markov, M.S.; Kuzmanova, M.A. e Ivanov, S.P., "Use of lectins as indicators for magnetic field action on erythrocyte membranes", *Rev. Environ. Health.*, 10(3-4), Julio-Diciembre, 1994: 243-246; Levshin, I.V., "Permeability of erythrocyte membranes from peripheral blood after exposure to low-frequency alternating electromagnetic field", *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, (1), Enero-Marzo, 1994: 17-19.

este tipo de radiaciones.

En lo referente a estudios equiparables al llevado a cabo por nosotros, existen pocos trabajos efectuados con tejido sanguíneo humano *in vitro*,²⁶⁴ además, estos trabajos examinan los efectos de campos magnéticos a frecuencia de micro-ondas, superiores a las de nuestra investigación.²⁶⁵ Así pues, los estudios *in vivo* constituyen la mayor parte de los realizados sobre tejido sanguíneo, tanto humano como de diferentes especies animales.

Algunos de los mencionados estudios se centran, principalmente, en los factores determinantes de la coagulación sanguínea,²⁶⁶ concluyendo que los campos electromagnéticos de baja frecuencia afectan de alguna manera

²⁶⁴ Uno de ellos, realizado en condiciones semejantes a las de nuestros ensayos es el de Dacha, M.; Accorsi, A.; Pierotti, C.; Vetrano, F.; Mantovani, R.; Guidi, G.; Conti, R. y Nicolini, P., "Studies on the possible biological effects of 50 Hz electric and/or magnetic fields: evaluation of some glycolytic enzymes, glycolytic flux, energy and oxido-reductive potentials in human erythrocytes exposed *in vitro* to power frequency fields", *Bioelectromagnetics.*, 14(4), 1993: 383-391. Otro estudio equiparable, aunque con sangre de ratas, es el de Ragan, H.A.; Buschbom, R.L.; Pipes, M.J.; Phillips, R.D. y Kaune, W.T., "Hematologic and serum chemistry studies in rats exposed to 60-Hz electric fields", *Bioelectromagnetics.*, 4(1), 1983: 79-90. En ninguno de los casos se describen cambios en los parámetros estudiados por efecto de los CEM aplicados.

²⁶⁵ Entre los escasos estudios que utilizan sangre humana irradiada *in vitro* a frecuencia de micro-ondas, podemos citar el trabajo de Dunscombe, P.B.; Gammampila, K. y Ramsey, N.W., "A search for nonthermal effects of 434 MHz microwave radiation on whole human blood", *Radiat. Res.*, 96(2), Noviembre, 1983: 235-250, en el que se describe un incremento en la fragilidad de la membrana eritrocitaria tras la exposición, aunque sin descartar el papel que el efecto térmico podría tener en dicho incremento. Un estudio posterior parece esclarecer este hecho, al concluir que altos niveles de micro-ondas provocan cambios inducidos por la temperatura en la estructura de las membranas celulares, se trata del trabajo llevado a cabo por Kim, I.uA; Kim, I.uV.; Kasimbekov, I.K. y Fomenko, B.S., "K⁺, H⁺, and Cl⁻ fluxes across erythrocyte membrane irradiated with radio frequency electromagnetic fields", *Biofis.*, 33(5), Septiembre, 1988: 837-840.

²⁶⁶ Es el caso de los estudios de Kuksinskii, V.E., "Coagulation properties of the blood and tissues of the cardiovascular system exposed to an electromagnetic field", *Kardiologija*, 18(3), Marzo, 1978: 107-111; Gorczynska, E. y Wegrzynowicz, R., "The effect of magnetic fields on platelets, blood coagulation and fibrinolysis in guinea pigs", *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 15(6), 1983: 459-468.

a dichos factores, no estando claros los mecanismos a través de los cuales los CEM ejercerían sus efectos en este aspecto.

Otros tantos trabajos llevan a cabo un control de los componentes de sangre proveniente de animales expuestos a la acción de CEM de baja frecuencia, tan solo como prueba adicional a otro tipo de investigación más completa, coincidiendo todos ellos en la inexistencia de efectos de los campos magnéticos apuntados sobre las características y componentes sanguíneos normales.²⁶⁷

Por todo lo expuesto, nos parece oportuno reiterar aquí la concordancia entre los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre tejido sanguíneo humano sometido a la acción de un campo magnético de baja frecuencia y los que, versando en la misma materia, distintos laboratorios han descrito a lo largo de las últimas décadas, en el sentido, como ya hemos indicado, de no hallarse cambios significativos inducidos por estos campos a

²⁶⁷ Así, por ejemplo, entre los estudios apuntados se cuentan los de Lorimore, S.A.; Kowalczyk, C.I.; Saunders, R.D. y Wright, E.G., "Lack of acute effects of 20 mT, 50 Hz magnetic fields on murine haemopoiesis", *Int. J. Radiat. Biol.*, 58(4), Octubre, 1990: 713-723; los del equipo de Margonato, V.; Veicsteinas, A.; Conti, R.; Nicolini, P. y Cerretelli, P., "Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats. I. 50 Hz electric fields", *Bioelectromagnetics.*, 14(5), 1993: 479-493; y "Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: II. 50 Hz magnetic fields", *Bioelectromagnetics.*, 16(6), 1995: 343-355; el de Boorman, G.A.; Gauger, J.R.; Johnson, T.R.; Tomlinson, M.J.; Findlay, J.C.; Travlos, G.S. y McCormick, L., "Eight-week toxicity study of 60 Hz magnetic fields in F344 rats and B6C3F1 mice", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 35(1), Enero, 1997: 55-63; el trabajo de Osbakken, M.; Griffith, J. y Taczanowsky, P., "A gross morphologic, histologic, haematologic, and blood chemistry study of adult and neonatal mice chronically exposed to high magnetic fields", *Magn. Reson. Med.*, 3(4), Agosto, 1986: 502-517; o el de Wolpaw, J.R.; Seegal, R.F. y Dowman, R., "Chronic exposure of primates to 60 Hz electric and magnetic fields: I. Exposure system and measurements of general health and performance", *Bioelectromagnetics.*, 10(3), 1989: 277-288.

intensidades que difícilmente se dan en la vida real.

V.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*.

Es evidente que únicamente los estudios *in vivo* con un buen diseño resultan apropiados para la investigación de un determinado riesgo ambiental, cuando incluso los expertos en clínica y epidemiología se hallan inseguros acerca de sus efectos. Resulta, en estos casos, implícitamente inexacto inferir unas potenciales consecuencias a partir de los experimentos *in vitro* llevados a cabo sobre la materia, ya que el investigador no se halla en condiciones de asegurar si alguna de sus observaciones llegará a manifestarse finalmente en los organismos vivos sometidos a las mismas condiciones del experimento. No obstante, es evidente que constituye un primer acercamiento al problema y, de esta manera, los estudios concernientes a mutagénesis, proliferación celular y alteración del tejido sanguíneo a partir de sistemas *in vitro*, no indican que los campos electromagnéticos posean la capacidad de afectar deletéreamente la proliferación celular, así como tampoco al tejido sanguíneo, a los niveles de exposición a los que la población se encuentra habitualmente expuesta.

No obstante, y con objeto de analizar la posible extrapolación de los datos obtenidos en los experimentos *in vitro* a los sistemas experimentales *in vivo*, que constituyen preparaciones más complejas y, por lo tanto, más próximas a la vida

real, se llevaron a cabo una serie de ensayos sobre animales completos (ratones y ratas adultos) cuyos resultados pasaremos a discutir a continuación.

V.2.1.- Discusión de los resultados obtenidos en el estudio de las variaciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, originadas por la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia.

Los estudios *in vivo* abarcan desde análisis del comportamiento de los seres expuestos al agente a estudio, hasta posibles efectos cancerígenos, pasando por secuelas sobre la fertilidad, reproducción, desarrollo embrionario, producción de hormonas, etc. El número de estudios realizados en animales de experimentación sobre la capacidad de los campos electromagnéticos de baja frecuencia para actuar como carcinógenos es reducido, a pesar de que esta aproximación es la más cercana a la epidemiológica.

Ya se ha señalado cómo numerosos estudios en materia de campos electromagnéticos de distintas frecuencias e intensidades postulan una acción por parte de estos sobre el equilibrio iónico celular,²⁶⁸ así como la

²⁶⁸ Además de los anteriormente citados, podemos añadir el estudio de Gorczynska, E. y Wegrzynowicz, R., "Effect of chronic exposure to static magnetic field upon the K⁺, Na⁺ and chlorides concentrations in the serum of guinea pigs", *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 30(2), 1986: 121-126; Aoki, H.; Yamazaki, H.; Yoshino, T. y Akagi, T., "Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line", *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 69(1), Julio, 1990: 103-106.

consiguiente desestabilización de estructuras membranosas que llega a permeabilizar las células afectadas. Asimismo existen profusos trabajos acerca de un posible efecto de este tipo de irradiación sobre la integridad de los capilares sanguíneos sometidos a su acción.²⁶⁹

Por todo lo anteriormente manifestado, a la hora de determinar algún tipo de efecto, *in vivo*, de los campos magnéticos de baja frecuencia, consideramos acertado investigar la posible influencia de dichos campos sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, ya que su estructura resulta, teóricamente, susceptible de sufrir daños derivados de este tipo de radiación; de existir tal efecto podría llegarse, en consecuencia, a inducir un desequilibrio homeostático capaz de derivar en la aparición de tumores cerebrales, entre otros trastornos de diversa severidad (mareos, cefaleas y demás perturbaciones de distinta etiología que los estudios epidemiológicos vienen describiendo en personas expuestas a campos magnéticos de frecuencia industrial). Dicha hipótesis, como ya se citó, ha sido apuntada por trabajos anteriores en radiofrecuencia.²⁷⁰

Tal y como expusimos al establecer los fundamentos biológicos de la parte experimental, la barrera hematoencefálica es la encargada de mantener el medio fisiológico entre ciertos límites esenciales para la vida o,

²⁶⁹ Izrael, M., "Changes in arterial elasticity after high-frequency electromagnetic field irradiation", *Probl. Khig.*, 5, 1980: 22-27.

²⁷⁰ Neubauer, C. et al., "Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz...", op. cit., 261-268; Salford, L.G. et al., "Permeability of the blood-brain barrier...", op. cit., 535-542.

lo que es lo mismo, asegura la homeostasis del medio en que ha de funcionar el cerebro, estando constituida por un complejo neurovascular que actúa como filtro capaz de regular el paso selectivo de moléculas desde la sangre hacia el cerebro.

En virtud de la naturaleza eléctrica del impulso nervioso, cuya difusión en la neurona depende de un desequilibrio iónico a ambos lados de su membrana plasmática, y cuya transmisión entre neuronas se lleva a cabo mediante productos químicos sencillos (adrenalina, noradrenalina, etc.), con los que fácilmente podrían competir los compuestos circulantes en sangre, la existencia de la barrera hematoencefálica cobra ampliamente todo su sentido. Podemos afirmar, pues, que resulta imprescindible para el correcto funcionamiento del sistema nervioso -y con él, del organismo todo-, tanto en la generación como en la transmisión y modulación del impulso nervioso, la existencia de algún tipo de barrera selectiva capaz de impedir el paso de las numerosas sustancias circulantes en sangre que podrían alterar el funcionamiento neuronal. Evidentemente, la integridad de la mencionada barrera es crucial para el mantenimiento de la función de “filtro” de estas estructuras que, nos permitimos reincidir en ello, están constituidas por un complejo neurovascular.

Una vez determinado el aspecto a investigar, se procedió a irradiar a los sujetos del estudio, ratones Balb/C, con un campo magnético de frecuencia 50 Hz e intensidad 27,5 Oersted (2,75 mT), de forma continua durante siete

días, tal como se describe en el correspondiente epígrafe del capítulo III de la presente tesis doctoral.

Los resultados que arrojan las diversas repeticiones del ensayo indican, sin lugar a dudas, que los campos magnéticos de la frecuencia e intensidad aplicados, en las condiciones del experimento, provocan cambios estadísticamente significativos en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los ratones expuestos a su acción, en el sentido de una permeabilización importante de la misma.²⁷¹

De igual manera, en los ensayos encaminados a establecer un posible sinergismo entre la acción del campo magnético señalado y el efecto tóxico del plomo en cerebro, se recogen resultados que confirman el hallazgo anteriormente apuntado, además de llegar a determinarse un efecto sinérgico entre ambas variables. Obviamente, el plomo, debido a su acción neurotóxica, afecta de alguna manera la integridad de la barrera hematoencefálica, de tal modo que la mayor permeabilización de esta se registra en el estudio de los cerebros de ratones tratados a la vez con plomo y campo magnético, resultando las diferencias entre este grupo y los tratados únicamente con plomo con significación estadística.

²⁷¹ Ribas, B.; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M. y Vázquez, M., "Interrelationships between extremely low frequency magnetic fields (50Hz) and chemical exposure on the blood brain barrier permeability", *XIII Międzynarodowa Konferencja Neurokowo-Techniczna*, ELSAF, 1, 2001:141-146.

No es de extrañar el mencionado efecto del plomo sobre el sistema nervioso en general, ya que, como vimos en su momento al tratar el tema, dicho metal bloquea importantes enzimas mitocondriales participantes en los procesos de obtención de energía en la célula al presentar gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas;²⁷² por otra parte, el exceso de plomo corporal inhibe la actividad de las ATPasas Na^+/K^+ ,²⁷³ cuyo papel resulta crucial en el mantenimiento de un ambiente constante en el cerebro durante las fluctuaciones en la composición del plasma.²⁷⁴

Asimismo, recordemos que existe evidencia suficiente que implica al estrés oxidativo en la toxicidad del plomo al fomentar éste, como hemos señalado en repetidas ocasiones, la formación de radicales hidroxilo y la peroxidación lipídica.²⁷⁵ El estrés oxidativo que, consecuentemente, desencadena el plomo,²⁷⁶ es generalizado, siendo igualmente inducido en el cerebro.²⁷⁷ Incidimos nuevamente en la consecuencia que el estrés

²⁷² Rodier, P.M., "Developing brain as a target of toxicity", *Environ. Health. Perspect.*, 103, supl.6, Septiembre, 1995: 73-76.

²⁷³ Patra, R.C. et al., "Effect of lead...", op. cit., 71-74.

²⁷⁴ Keep, R.F. et al., "Blood- brain barrier mechanisms...", op. cit., 200-205.

²⁷⁵ Gurer, H. et al., "Antioxidant role of ..", op. cit., 75-81. El-Missiry, M.A., "Prophylactic effect of...", op.cit., 57-62.

²⁷⁶ Recientes trabajos demuestran la influencia del estrés oxidativo en la permeabilidad de la BHE. Entre ellos se cuentan los de Lagrange, P.; Romero, I.A; Minn, A. y Revest, P.A., "Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier", *Free Radic. Biol. Med.*, 27(5-6), Septiembre, 1999: 667-672; Reinholz, M.M.; Haggard, J.J.; Curran G.L. y Poduslo, J.F., "Plasma pharmacokinetics, nervous system biodistribution and biostability, and spinal cord permeability at the blood-brain barrier of putrescine- modified catalase in the adult rat", *Exp. Neurol.*, 159(1), Septiembre, 1999: 191-203; Gupta, A.; Nigam, D.; Shuckla, G.S. y Agarwal, A.K., "Effect of pyrethroid-based liquid mosquito repellent inhalation on the blood- brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats", *J. Appl. Toxicol.*, 19(1), Enero-Febrero, 1999: 67-72, entre otros.

²⁷⁷ Jindal, V. et al., "Etanol potentiates lead-induced inhibition of rat brain antioxidant...", op. cit., 43-49.

oxidativo supone para la integridad de las membranas celulares, al originar cambios en sus potenciales y alterar la fluidez de las mismas.²⁷⁸

A la vista de los efectos que, mediante mecanismos diferentes, presenta el plomo sobre la permeabilidad de las membranas celulares, no es de extrañar que, entre los daños inducidos en el cerebro, se cuente la permeabilización de la barrera hematoencefálica, máxime teniendo en cuenta que esta estructura se halla conformada por la peculiar morfología de los capilares sanguíneos cerebrales.

Hemos de tener presente que la integridad de la barrera radica, precisamente, en las fuertes uniones (mediante zónulas occludens, uniones estrechas) de las células endoteliales, que no dejan prácticamente espacios libres entre ellas, cerrando herméticamente el espacio intercelular; a esto hay que añadir las dos envolturas que suponen la capa de pericitos y las terminaciones de la glia perivascular (los pies perivascuales), asimismo conectados por uniones estrechas. De esta manera se asegura una separación casi impermeable entre los compartimentos que constituyen el lumen del vaso, el espacio perivascular y el perineuronal.

Cualquier molécula presente en el torrente sanguíneo ha de atravesar, por tanto, la pared endotelial, la lámina basal del endotelio, la lámina basal

²⁷⁸ Zaidi, A. y Michaelis, M.L., "Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase", *Free-Radic. Biol. Med.*, 27(7-8), Octubre, 1999: 810-821.

de los pies astrocitarios y, finalmente, el citoplasma de dichos pies astrocitarios, antes de llegar al líquido extracelular que baña el parénquima nervioso. Vemos, pues, cómo todos estos mecanismos destinados a mantener el sellamiento selectivo de la barrera, dependen de un perfecto funcionamiento de las membranas celulares, que deben mantener su actividad normal a fin de asegurar la impermeabilidad (o, más bien, permeabilidad selectiva) de la BHE.

Dicho esto, resulta evidente que en los ratones tratados con altas dosis de plomo (0,1 mg/Kg), el estudio de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica debía mostrar unos resultados, como así ha sido, positivos respecto a los controles, en el sentido de un aumento estadísticamente significativo de la citada permeabilidad.

Lo anteriormente expuesto incumbe al plomo, y hemos visto el cómo y el porqué de los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo con el metal. No obstante no hemos entrado a discutir la justificación de los datos obtenidos en el estudio de este parámetro (la permeabilidad de la BHE) bajo los efectos del campo magnético, lo que haremos a continuación.

Existen, en los seres vivos, corrientes eléctricas endógenas debidas al proceso normal de las reacciones químicas; únicamente aquellos campos electromagnéticos capaces de inducir corrientes significativamente más intensas que las fisiológicas, podrían, en teoría, ser susceptibles de

provocar efectos adversos inmediatos mediante la modificación del transporte iónico y los canales de membrana.

Sin embargo es bien conocido, según se ha señalado con anterioridad, uno de los efectos de los campos electromagnéticos de baja intensidad y que estos ejercen incluso a intensidades terapéuticas: el de magnetización. Abundando en el tema, este efecto favorece los procesos de difusión a través de la membrana celular, al provocar un aumento en su permeabilidad.²⁷⁹

Por otra parte, existe evidencia científica sobrada que implica a las metaloproteinasas de matriz en el daño cerebral producido por diversos agentes tóxicos o patologías.²⁸⁰ Ya apuntamos en su momento que estas enzimas, presentes normalmente en el cerebro en formas inactivas, son liberadas al espacio extracelular para degradar su matriz durante el crecimiento o en las ocasiones en que es necesaria la remodelación de las estructuras capilares. No obstante, estas enzimas, una vez activadas, contribuyen al proceso lesivo del cerebro, atacando la lámina basal y

²⁷⁹ Gorczynska, E. et al., "Effect of chronic exposure to static magnetic field...", op. cit., 121-126; Cherkasov, G.V., "State of erythrocytes after...", op. cit., 72-75; Loginov, V.A. et al., "The permeability of rat erythrocyte membranes...", op. cit., 71-75; Traikov, L.L. et al., "Use of lectins as indicators for magnetic field...", op. cit., 243-246; Levshin, I.V., "Permeability of erythrocyte membranes...", op. cit., 17-19, etc.

²⁸⁰ Rosenberg, G.A; Estrada, E.Y. y Dencoff, J.E., "Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain", *Stroke*, 29(10), Octubre, 1998: 2189-2195; Yong, V.W. et al., "Matrix metalloproteinases and...", op. cit., 75-80; Lukes, A. et al., "Extracellular matrix degradation...", op. cit., 267-284; Gasche, Y. et al., "Early appearance of activated...", op. cit., 1020-1028; Kieseier, B.C. et al., "Differential expression...", op. cit., 1579-1587, entre otros.

abriendo, consecuentemente la BHE.²⁸¹ Se ha comprobado que estas proteasas son inducidas por citokinas y reguladas por factores de crecimiento.²⁸²

En otro orden de cosas, que relacionaremos a continuación con el tema, existen diversos estudios que describen un incremento en la producción de citokinas en células monocíticas expuestas a un campo magnético de baja frecuencia,²⁸³ así como otros tantos que concluyen el paso de las citokinas y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) al cerebro a través de la BHE, proponiendo la existencia incluso de un transporte activo para ellos a través de dicha barrera.²⁸⁴ Podemos, en base a lo expuesto, aventurar la tesis de que dichas radiaciones, mediante este aumento en las concentraciones de citokinas, activan las MMP en mayor o menor medida, de manera que la integridad de la BHE resulta comprometida por la degradación de la matriz extracelular que aquéllas llevan a cabo.

²⁸¹ Rosenberg, G.A.; et al., "Matrix metalloproteinases and TIMPs...", op. cit., 2189-2195. Yong, V.W. et al., "Matrix metalloproteinases and...", op. cit., 75-80.

²⁸² Mun-Bryce, S. y Rosenberg, G.A., "Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases", *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 18(11), Noviembre, 1998: 1163-1172.

²⁸³ Cossarizza, A.; Angioni, S.; Petraglia, F.; Genazzani, A.R.; Monti, D.; Capri, M.; Versan, F.; Cadossi, R. y Franceschi, C., "Exposure to low frequency pulsed electromagnetic fields increases interleukin-1 and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells", *Exp. Cell. Res.*, 204(2), Febrero, 1993: 385-387; Lagalla, R.; Lio, D.; Gervasi, F.; De-María, M.; Lo-Casto, A.; Salerno, S. y Cardinale, A.E., "An experimental in-vitro evaluation of membrane antigen expression and of interleukin production by monocytes exposed to magnetic resonance", *Radiol. Med. Torino*, 91(3), Marzo, 1996: 292-296; Salerno, S.; Lo-Casto, A.; Caccamo, N.; d'Anna, C.; De-María, M.; Lagalla, R.; Scola, L. y Cardinale, A.E., "Static magnetic fields generated by a 0.5 T MRI unit affects in vitro expression of activation markers and interleukin release in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)", *Int. J. Radiat. Biol.*, 75(4), Abril, 1999: 457-463.

²⁸⁴ Gaillard, R.C., "Cytokines in the...", op. cit., 181-216; van-der-Mast, R.C., "Pathophysiology of delirium", *J. Geriatr. Psychiatry. Neurol.*, 11(3), 1988: 138-145; Pan, W. y Kastin, A.J., "Entry of EGF into brain is rapid and saturable", *Peptides*, 20(9), 1999: 1091-1098.

La suma de todos los efectos descritos para los campos electromagnéticos de baja frecuencia (permeabilización de membranas celulares, activación de MMP, aumento de la fragilidad capilar), documentados con los resultados de los numerosos estudios experimentales a que aludíamos al principio de este epígrafe²⁸⁵ respecto a la integridad de los capilares sanguíneos sometidos a la acción de este tipo de radiación, explican, al menos en parte, el resultado obtenido por nuestro estudio al comparar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de los ratones expuestos a la acción del campo magnético de 50 Hz con la de ratones no expuestos, que muestra, como dijimos, un patente aumento, estadísticamente significativo, debido a la presencia de estas radiaciones.

De la misma manera se explica el sinergismo observado entre el efecto del plomo y el del campo magnético descrito, viéndose potenciada la acción permeabilizadora del metal por la presencia del campo magnético aplicado. Esta potenciación por parte de un campo magnético de baja frecuencia, del daño oxidativo producido por agentes oxidantes, se encuentra descrita en algunos trabajos recientes sobre la materia.²⁸⁶

Asimismo corroboran estos resultados otros estudios sobre la influencia

²⁸⁵ Izrael, M., "Changes in arterial elasticity...", op. cit., 22-27; Shlygin, V.V., "Possible changes in blood vessels during exposure to electromagnetic field", *Biofizika*, 39(5), Septiembre-Octubre, 1994: 903-910.

²⁸⁶ Así el estudio *in vitro* de Fiorani, M.; Biagiarelli, B.; Vetrano, F.; Guidi, G.; Dacha, M. y Stocchi, V., "In vitro effects of 50 Hz magnetic fields on oxidatively damaged rabbit red blood cells", *Bioelectromagnetics*, 18(2), 1997: 125-131, o el más reciente de Lagrange, P. et al., "Transendothelial permeability changes induced by free radicals...", op. cit., 667-672.

de campos electromagnéticos de baja frecuencia en la permeabilidad de la BHE, que concluyen, como nosotros, que existe un debilitamiento en la integridad de la BHE debida a la exposición a este tipo de campos, aunque ninguno propone un posible mecanismo de acción para ellos.²⁸⁷

Parece obligado, en este punto, hacer una referencia al caso de la resonancia magnética. A pesar de ser la intensidad de campo magnético utilizado en esta técnica superior con mucho a la intensidad del campo por nosotros aplicado, existen trabajos que estudian la repercusión que, sobre la permeabilidad de la BHE, tiene la técnica diagnóstica de la resonancia magnética. Los mencionados estudios atribuyen a los campos magnéticos utilizados en dicha práctica un efecto permeabilizador de la barrera, lo que confirma, en otro aspecto, nuestros hallazgos al respecto.²⁸⁸

Tras la exposición precedente, nos vemos obligados, una vez más, a

²⁸⁷ Por ejemplo el realizado *in vivo* sobre líquido céfalo- raquídeo de vacas expuestas a un campo de 60 Hz y 30 μ T, por el equipo de Burchard, J.F.; Nguyen, D.H.; Richard, L.; Young, S.N.; Heyes, M.P. y Block, E., "Effects of electromagnetic fields on the levels of biogenic amine metabolites, quinolinic acid, and beta-endorphin in the cerebrospinal fluid of dairy cows", *Neurochem. Res.*, 23(12), Diciembre, 1998: 1527-1531, o el del equipo de Person, B.R.; Salford, L.G.; Brun, A.; Eberhardt, J.L. y Malmgren, L., "Increased permeability of the blood brain barrier induced by magnetic and electromagnetic fields", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 649, 1992: 356-358.

²⁸⁸ Toroptsev, I.V. y Soldatova, L.P., "Pathomorphological reactions of the cerebral cortex nerve elements during treatment with an alternating magnetic field", *Arkh. Patol.*, 43 (11), 1981: 33-36; Garber, H.J.; Oldendorf, W.H.; Braun, L.D. y Lufkin, R.B., "MRI gradient fields increase brain nannitol space", *Magn. Reson. Imaging*, 7 (6), 1989: 605-610; Prato, F.S.; Frappier, J.R.; Shivers, R.R.; Kavaliers, M.; Zabel, P.; Drost, D. y Lee, T.Y., "Magnetic resonance imaging increases the blood-brain barrier permeability to 153-gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid in rats", *Brain Res.*, 523, 1990: 301-304; Prato, F.S.; Wills, J.M.; Roger, J.; Frappier, H.; Drost, D.J.; Lee, T.Y.; Shivers, R.R. y Zabel, P., "Blood-brain barrier permeability in rats is altered by exposure to magnetic fields associated with magnetic resonance imaging at 1,5 T", *Microsc. Res. Tech.*, 27 (6), 1994: 528-534.

recordar que estos resultados se corresponden con ensayos en los que la intensidad del campo magnético aplicado es, con mucho, superior a aquel generado por las líneas eléctricas, y al que, en consecuencia, se puede hallar expuesta la población en los casos de exposiciones residenciales.

Así, como se ha apuntado en repetidas ocasiones, la intensidad por nosotros utilizada es de 2.750 μT (27,5 G), frente a las 20 μT que presentan, como máximo, los campos magnéticos generados por las líneas de alta tensión mencionadas, es decir, unas 140 veces más alta.

V.2.2.- Discusión de los resultados obtenidos en la determinación y estudio de alteraciones de las propiedades eléctricas de tejidos de rata mediante irradiación con campos electromagnéticos de radiofrecuencia.

Tanto en el terreno terapéutico como en el de la diagnosis o en el de la prevención de riesgos, las propiedades eléctricas de los tejidos revisten una importancia crucial, al ser características determinantes e intransferibles de cada tipo de tejido y definir, por consiguiente, el comportamiento de éstos frente a ciertos estímulos físicos concretos.

Hemos manifestado con anterioridad cómo uno de los principales problemas a la hora de comparar los resultados de los diferentes estudios realizados en el campo de las radiaciones no ionizantes, es precisamente la

ausencia de acuerdos acerca de las referencias dosimétricas. También explicamos que la determinación del SAR es una función complicada, dependiente de varios parámetros de exposición, como son el valor de la densidad de corriente inducida por la radiación en el tejido y las propiedades físicas del tejido biológico en cuestión.

Por otra parte, la interacción de campos eléctricos, variables en el tiempo, con los tejidos biológicos, que presentan asimismo una diferencia de carga eléctrica a ambos lados de la membrana celular, tiene como consecuencia, según se ha manifestado varias veces a lo largo de la presente tesis doctoral, un aumento en el flujo de cargas eléctricas, la formación de dipolos eléctricos y la reorientación de los dipolos ya existentes en la membrana. Las magnitudes relativas de estos efectos dependen de las propiedades de la estructura sobre la que incide el campo,²⁸⁹ es decir, conductividad y permitividad.²⁹⁰ Así, por ejemplo, la densidad de corriente (cantidad dosimétrica básica para campos con frecuencias inferiores a 1MHz), depende de la conductividad del tejido sobre el que incide la radiación, y es sabido que un valor elevado de permitividad implica un considerable efecto protector frente al campo eléctrico, al

²⁸⁹ ICNIRP, "Guidelines for limiting...", op. cit., 494-520.

²⁹⁰ Permitividad: constante de proporcionalidad, característica del medio material considerado, que aparece en la ley de Coulomb de la electrostática. Es una de las denominadas *constantes universales*, magnitudes no relacionadas con las propiedades particulares de un sistema físico, sobre cuyos valores numéricos se basan las predicciones cuantitativas realizadas al describir los fenómenos naturales.

Conductividad: constante de proporcionalidad que relaciona la densidad de corriente eléctrica en el interior de un conductor con la intensidad del campo eléctrico que da origen a la misma. Es una constante característica de cada sustancia independiente de la forma y dimensiones del conductor.

constituir la permitividad una medida de la capacidad de un material para resistir la formación de un campo eléctrico.

Abundando en lo anterior, en el caso de la existencia de varios cables conductores, como en los circuitos de una línea de alta tensión, se ha de considerar la presencia, tanto de campos vectoriales (eléctricos y magnéticos), como escalares. La característica que diferencia estos dos tipos de campos consiste en que en los primeros, los vectoriales, se dan fenómenos de resonancia, mientras que en los segundos éstos no se producen. Ello no quiere decir que los campos escalares no afecten a los tejidos biológicos, sino únicamente que sus efectos son bastante uniformes para todo el rango de frecuencias; por el contrario, los efectos biológicos de los campos vectoriales se acentúan mucho cuando su frecuencia está en resonancia con la frecuencia respectiva de los tejidos sometidos a su acción. Es decir, al producirse una sintonía entre la frecuencia del campo exterior y la frecuencia de absorción de un tejido determinado, se observa una hipersensibilidad del tejido a la energía exterior en dicho rango de frecuencias.

No obstante, según la posición relativa de los cables, la suma vectorial de dichos campos puede ser muy pequeña e, incluso, llegar a anularse. Ahora bien, que el campo vectorial total, la suma de los campos vectoriales eléctricos o de inducción magnética sea muy pequeño, no quiere decir que la energía en dicho punto haya desaparecido, ya que, como indicábamos,

sigue existiendo un campo eléctrico escalar que actúa asimismo sobre los tejidos biológicos aunque sin dar lugar a fenómenos de resonancia.

La consecuencia de las propiedades dieléctricas de un medio determinado es, pues, que un campo eléctrico externo puede inducir otro campo diferente en su interior. Este campo, denominado *macroscópico*, es debido a interacciones a todos los niveles de organización del material que conforma el medio, así como al establecimiento de campos locales microscópicos. En el caso de materiales biológicos, el conocimiento de estos campos e interacciones es necesario a fin de valorar su significado biológico, optimizar sus aplicaciones y asesorar en cuanto a sus riesgos y sus potenciales implicaciones para la salud.

En base a lo anteriormente expuesto, resulta inmediata la deducción de que las propiedades eléctricas de un tejido constituyen factores determinantes a la hora de predecir el comportamiento de éste frente a un estímulo físico como son las radiaciones electromagnéticas, siendo estas propiedades responsables de la interacción de dichos campos con moléculas o estructuras supramoleculares. Así, el sistema nervioso y los líquidos conductores del organismo (sangre, líquido céfalo- raquídeo), al igual que le ocurre a cualquier conductor en el seno de un campo eléctrico, ven disminuida su conductividad por efecto de un campo eléctrico externo: las cargas presentes en los plasmas o líquidos conductores, como las de linfocitos y hematíes, pierden energía, es decir, se debilitan.

Debido a la naturaleza compleja de los estudios en materia de electromagnetismo, la investigación de los efectos biológicos de los campos electromagnéticos exige el análisis combinado de los campos en cuestión y el sistema biológico elegido como diana de éstos; ello obliga a una cooperación entre los expertos del ámbito de la física, que deben caracterizar los campos y construir los aparatos apropiados para la investigación, y los científicos pertenecientes al campo de la biología o la epidemiología, que diseñarán el modelo experimental y los puntos concretos

a estudio dentro del sistema biológico elegido.²⁹¹ El perfecto control de la exposición a la que se va a someter a los sujetos de experimentación debe formar parte de todo diseño experimental minucioso a fin de que resulte irrefutable. Por consiguiente, los aparatos de exposición han de ser proyectados²⁹² de manera que se adapten al sistema biológico, además de conseguir una exposición uniforme y controlada a la intensidad de campo propuesta. También para lograr este objetivo es imprescindible el conocimiento de las propiedades eléctricas de los tejidos.

Forzoso es aceptar que, en orden sobre todo a los problemas que las distintas técnicas actuales plantean, resulta imprescindible hallar un método

²⁹¹ Valberg, P.A., "Designing EMF experiments: what is required to characterize "exposure"?", *Bioelectromagnetics*, 16(6), 1995: 396-406.

²⁹² Misakian, M.; Sheppard, A.R.; Krause, D.; Frazier, M.E. y Miller, D.L., "Biological, physical and electrical parameters for *in vitro* studies with ELF electric and magnetic fields. A primer", *Bioelectromagnetics Suppl.*, 2, 1993: 1-73.

seguro y sensible, que ayude a la hora de establecer las propiedades dieléctricas de los tejidos y, en base a ellas, su posible reacción ante los campos electromagnéticos presentes en el medio como contaminantes ambientales.

Por otra parte, los seres vivos se encuentran, en mayor o menor medida, continuamente expuestos a los efectos de otro tipo de contaminación, la de agentes químicos como los metales, que pueden llegar a afectar al organismo hasta el punto de que los tejidos implicados no sean capaces de realizar sus funciones adecuadamente.²⁹³ En estos casos, incluso las propiedades eléctricas de dichos tejidos se ven alteradas.

La consideración del conjunto de argumentos previamente expuesto nos impulsó, en esta parte de nuestro estudio, a la búsqueda de un método capaz de determinar la variación de las propiedades eléctricas de los tejidos ante las ondas de radiofrecuencia, en presencia de agentes naturales –químicos ambientales- siguiendo los consejos del Parlamento Europeo,²⁹⁴ tal y como señalamos en el *Planteamiento del problema*, a la vez que se relacionan las variaciones observadas en la permitividad y conductividad con los parámetros bioquímicos y enzimáticos de los análisis de sangre de los individuos estudiados.

²⁹³ En Patología es conocida, en este sentido, la denominada tesaurosismosis metálica, provocada por diversos iones, principalmente de hierro, zinc y cobre.

²⁹⁴ Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Nº C 205/440, Documento Nº A3-0238/94 del 5 de Mayo de 1994.

A tal fin, se llevaron a la práctica experimentos con ratas macho de raza Wistar tratadas con dosis crecientes de plomo y hierro, para una posterior determinación de las propiedades eléctricas de varios de sus tejidos a la frecuencia industrial de 2,45 GHz, siguiendo las pautas que se detallan en el correspondiente apartado del capítulo III de la presente tesis doctoral.

Recordemos a modo de breve resumen, ya que los resultados de los referidos ensayos se hallan suficientemente pormenorizados en el capítulo oportuno, que los datos obtenidos establecían diferencias, de distinto signo según el órgano de que se trate, estadísticamente significativas en la permitividad de la totalidad de los tejidos pertenecientes a los animales tratados con plomo respecto a los del grupo control, así como en la permitividad de todos los tejidos, excepto el pulmonar, provenientes de los animales tratados con hierro respecto a los controles. En lo que concierne a la conductividad, se hallaron diferencias estadísticamente significativas, en el sentido de una disminución, entre los tejidos de los animales del grupo control y la totalidad de los tejidos pertenecientes a los animales tratados con ambos metales, plomo y hierro. Los resultados señalados ratifican la suposición previa de que este tipo de contaminantes químicos puede alterar las propiedades eléctricas de los tejidos a los que afectan, condicionando, en consecuencia, su respuesta ante agresiones de tipo físico como son las radiaciones provenientes de los campos electromagnéticos

ambientales.²⁹⁵

Por otra parte, los datos aquí obtenidos son coherentes con los valores derivados de los análisis sanguíneos, así como con aquellos arrojados por la determinación de las cantidades de metal depositadas en los distintos órganos estudiados.

Así en el caso de la sobrecarga orgánica de hierro que, como es bien sabido, provoca principalmente daños en páncreas e hígado en los casos de hemocromatosis,²⁹⁶ se comprueba un aumento en las concentraciones séricas de las enzimas hepáticas, debido a la interferencia del hierro con dichas enzimas del parénquima, cuya actividad en los procesos oxidativos se ve en este caso aumentada: los hepatocitos constituyen uno de los sitios de mayor almacenamiento de hierro, viéndose, en casos de sobrecarga de éste, prácticamente “bombardeados” por las ROS, que ocasionan su muerte,²⁹⁷ siendo entonces reemplazados por fibroblastos; el colágeno que estos producen conduce a la fibrosis hepática y, finalmente, a la cirrosis.

²⁹⁵ García Arribas, O.; Pérez Calvo, M.; Sebastián, J.L.; Muñoz San Martín, S.; Sancho, M.; Miranda, J.M.; Rodríguez, L.P.; Escribano, J.M. y Ribas, B., “Efecto del cadmio, plomo y mercurio sobre la permitividad y conductividad eléctrica a frecuencias de microondas”, en: J.L. Bardasano ed., *Instituto Bioelectromagnetismo Alonso de Santa Cruz*, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, 1999; O. García Arribas, M. Pérez Calvo, J. L. Sebastián, S. Muñoz, M. Sancho, J. M. Miranda, J. M. Escribano, L. P. Rodríguez, B. Ribas., “Effects of heavy metals on dielectrical properties of tissues at microwave frequencies”, *Metal Ions in Biology and Medicine*, 6, en: John Libbey Eurotext, Paris, France, 2000: 147-149; Ribas, B.; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M.; Sebastián, J. L.; Muñoz, S. y Garrido, J.A., “Determinación de la permitividad y conductividad eléctricas a la frecuencia de microondas de varios tejidos de ratas tratadas con cadmio”, *An. Real Acad. Farmacia*, 67(1), 2001: 15-25.

²⁹⁶ Kostial, K.; Rabar, I.; Blanusa, M. Y Simonovic, I., “The effect of iron additive to milk on cadmium, mercury and manganese absorption in rats”, *Environ. Res.*, 22, 1980: 40-45.

²⁹⁷ Bonkovsky, H.L., “Iron and the liver”, op. cit., 32- 43.

De igual manera se constata un aumento en las concentraciones séricas de hierro que, aunque no llega a ser significativo estadísticamente, conduce a daños en el tejido renal.²⁹⁸ En lo tocante a las diferencias extremadamente significativas observadas en la conductividad del tejido pancreático de los animales tratados con hierro, ya vimos cómo el análisis del ICP-MS descubría el mayor cúmulo de hierro en este órgano. Este hecho se explica fácilmente por la excesiva absorción a nivel gastro-intestinal que hace que el metal se deposite en las células parenquimatosas del páncreas, lo que da lugar a lesiones físicas y alteraciones funcionales, entre las que cabe destacar la diabetes. El aumento de glucosa en sangre es un reflejo de dicho daño, ya que indica una disminución en la secreción de insulina por parte del páncreas.

Al determinar la cantidad de hierro en pulmón, éste resulta ser el tejido con una mayor concentración de metal. La existencia en el pulmón de grandes cantidades de sangre, al ser un tejido muy vascularizado, explica este hecho, máxime si se advierte que en los tejidos control las cantidades de hierro son, asimismo, elevadas y prácticamente iguales a las observadas en los tejidos de animales tratados con el metal. El exceso de hierro no se deposita en pulmón, por lo que, como exponíamos, la cantidad del metal determinada en el tejido procede principalmente de la hemoglobina sanguínea. En consecuencia, la permitividad del tejido pulmonar del grupo

²⁹⁸ Tyson, *Methods in Toxicology*, Academic Press, Julio, 1994.

tratado con hierro no presenta variaciones significativas respecto a la del grupo control. Como se puede constatar en la exposición de resultados, no obstante, hay un ligero aumento en el depósito de hierro en pulmón, lo suficientemente ligero para no afectar a la permitividad del tejido, pero no tanto como para no afectar a su conductividad, que sí resulta estadísticamente disminuida respecto a los controles.

A su vez, en lo que respecta a la determinación de las propiedades eléctricas de los tejidos pertenecientes a animales tratados con plomo, los resultados se encuentran en total concordancia con aquellos obtenidos en los análisis complementarios de sangre y trazas de metal en órganos, ya que, como se indicó en su momento, el plomo, una vez absorbido, se distribuye por todo el organismo, principalmente “secuestrado” por los eritrocitos, y se deposita en hígado, bazo y riñones, para ser finalmente eliminado por vía urinaria, que resulta ser la ruta de eliminación de Pb inorgánico más importante.

Uno de los síntomas generales de la intoxicación crónica por plomo, como se recordará, es la anemia microcítica e hipocrómica por desórdenes del metabolismo de la porfirina. El plomo actúa impidiendo la formación de la hemoglobina y provoca fragilidad eritrocitaria, disminuyendo el tiempo de vida de los eritrocitos,²⁹⁹ lo que explica la disminución de los valores de hematocrito y hemoglobina observados. Asimismo se justifica el descenso

²⁹⁹ Patra, R.C. et al., “Effect of lead on erythrocytic antioxidant...”, op. cit., 71- 74.

en la concentración de proteínas totales, ya que el plomo provoca inhibición en la síntesis de proteínas, probablemente modificando el ARN de transferencia. A su vez, las células epiteliales de la nefrona parecen especialmente sensibles a la intoxicación por plomo: en esa situación se produce una disminución de la reabsorción tubular de glucosa y aminoácidos, con la consiguiente aminoaciduria, hipofosfatemia y glucosuria. Además, la sobrecarga de metales pesados induce una excesiva secreción de insulina plasmática, lo que redundaría en bajos niveles de azúcar en sangre. Por su parte, el aumento en las cantidades de enzimas hepáticas indica, al igual que ocurre con el hierro, lesión hepática y, en el caso de la LDH, que como ya se señaló es eritrocitaria, dicho aumento resulta, al mismo tiempo, indicador de daño eritrocitario.

Queda patente, pues, la correspondencia entre las variaciones detectadas en las propiedades eléctricas de los distintos tejidos estudiados y el estado del órgano del que provenían, dependiendo del tipo de intoxicación a que se vieron sometidos los animales.

Existen, de cualquier manera, y debido a los progresos recientes en el campo de la dosimetría electromagnética, modelos anatómicos, tanto de animales como de humanos, de alta resolución que permiten la realización de ejercicios numéricos de simulación, aptos para el estudio de las propiedades eléctricas de hasta treinta tipos de tejidos diferentes a diversas frecuencias de irradiación. No obstante, sigue sin haber, hasta el momento,

consenso en cuanto a los datos dieléctricos aportados por los estudios en la materia.³⁰⁰ Este hecho se explica principalmente por la dificultad que, en la práctica, entraña la medida de materiales conductores en el rango de frecuencia de 10 Hz a 10 MHz, al resultar las medidas distorsionadas por dos fuentes de error: la polarización del electrodo y los errores sistemáticos de la inductancia del terminal, que llegan a ser evidentes en los límites inferior y superior del rango de frecuencia bajo consideración. Por ende, la temperatura juega asimismo un papel importante, siendo los coeficientes de temperatura, tanto para la permitividad como para la conductividad, dependientes del tipo de tejido y de la frecuencia empleadas.³⁰¹

Los datos aportados por nuestro estudio vienen, pues, a sumarse a los ya existentes en la materia, constituyendo una contribución más en el establecimiento definitivo de valores de referencia válidos para las previsiones del comportamiento de los tejidos frente a los campos electromagnéticos, tanto con fines terapéuticos y de diagnosis, como de prevención de riesgos ambientales y laborales.

³⁰⁰ Existen varias revisiones exhaustivas de los trabajos que sobre la materia se han realizado en las pasadas cinco décadas. Entre ellas se cuentan la de Geddes, L.A. y Baker, L.E., "The specific resistance of biological material. A compendium of data for the biomedical engineer and physiologist", *Med. And Biol. Engin.*, 5, 1967: 271-293, el de Stuchly, M.A. y Stuchly, S.S., "Dielectric properties of biological substances- tabulated", *J. of Microwave Power*, 15(1), 1980: 19-26, o los más recientes de Foster, K.R. y Schwan, H.P., "Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review", *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 17(1), 1989: 25-104, y Duck, F.A., *Physical properties of tissue: A comprehensive reference book*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1990.

³⁰¹ Gabriel, C. y Gabriel, S., *Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF & Microwave Frequencies*, King's College, Londres, AL/OE-TR-1996-0037, 1996.

No podemos cerrar este capítulo sin comentar, siquiera someramente, dos propuestas que, a la hora de explicar los efectos biológicos de los campos electromagnéticos, han sido sugeridas: la cuestión de la hipersensibilidad eléctrica y la hipótesis de las partículas aéreas.

Respecto a esta última, se ha postulado que los efectos biológicos observados en exposiciones residenciales a campos electromagnéticos de frecuencia industrial, podían ser debidos a la atracción y acumulación, por parte de las líneas del tendido eléctrico, de partículas nocivas presentes en el aire a bajas concentraciones.

Dicha hipótesis obedece al hecho de que las bases de una supuesta relación entre leucemia y exposición a campos ELF son desconocidas, por lo que algunos investigadores han especulado sobre la posibilidad de que otros factores, generalmente agentes contaminantes químicos, potencialmente ligados a la presencia de las líneas, pudieran ser los verdaderos causantes de la débil asociación descrita.

Como se expuso en su momento, las líneas eléctricas generan campos eléctricos alternos y modifican los campos eléctricos estáticos de sus proximidades. Estos campos eléctricos, en caso de ser lo suficientemente grandes, pueden alterar la concentración o el transporte de partículas aéreas (incluyendo aquellas perjudiciales para la salud), provocando, por ejemplo, la

deposición de partículas cargadas, la polarización de partículas neutras, o la producción de iones. Se ha sugerido, como ya dijimos, que esto podría desembocar en efectos adversos para la salud. En base a esta suposición, se procedió al examen de ciertas consideraciones teóricas, así como de evidencia experimental concerniente a ocho mecanismos que, hipotéticamente, involucran a las líneas eléctricas y las partículas aéreas. En cuanto a las citadas consideraciones teóricas, ninguno de estos mecanismos debería conducir a consecuencia adversa alguna para la salud, principalmente porque los efectos producidos son tan pequeños que se encuentran solapados por las corrientes de aire o por la fuerza de la gravedad, y porque la población pasa un tiempo limitado en las zonas en las que se dan estas condiciones.

La evidencia experimental pesa asimismo en contra de cualquier efecto adverso para la salud. Es más, incluso si se produjeran, debido a las partículas aéreas, efectos desfavorables para la salud, estos serían distintos de aquellos sugeridos por los estudios epidemiológicos existentes y que conciernen a las líneas de alta tensión.³⁰²

En lo que respecta al denominado “síndrome de hipersensibilidad electromagnética”, se basa en la evidencia de que no todos los sujetos desarrollan las mismas reacciones ante una determinada condición. Ciertas características propias de cada individuo determinan la magnitud y naturaleza,

³⁰² Swanson, J. y Jeffers, D., “Possible mechanisms by which electric fields from power lines might affect airborne particles harmful to health”, *J. Radiol. Prot.*, 19(3), Septiembre, 1999: 213-229.

tanto de sus reacciones frente a un determinado agente nocivo, como de las consecuencias que sufrirá en respuesta a la exposición a dicho agente. Así, los parámetros fisiológicos y bioquímicos individuales juegan un papel importante en la generación de problemas de salud. Tanto en el trabajo como fuera de él, las personas se ven expuestas a numerosos factores que ponen a prueba su capacidad de adaptación, que es limitada. Así, el efecto sinérgico de estos factores sobre la persona va minando su capacidad de resistencia o de adaptación, de manera que, tal vez, un aspecto, en principio nimio, puede ser el desencadenante de una reacción en el individuo.

En este sentido, como ya se dijo, existe una serie de estudios recogidos en la Europa del Este desde los años ochenta, acerca de ciertos síntomas cuyo conjunto se ha venido a denominar “microwave sickness” (MWS), y que incluye fatiga y dolores de cabeza, así como otros efectos que implican al sistema nervioso, observados en trabajadores expuestos a emisiones de RF. A pesar del escepticismo con que el supuesto síndrome fue acogido en un principio por los países de Europa Occidental, hay expertos que consideran que el síndrome de MWS podría constituir una verdadera entidad médica que debería ser reconocida como posible factor de riesgo para la salud de los trabajadores expuestos a RF.³⁰³

³⁰³ Hocking, B., “Microwave sickness...”, Op. cit., 66-69.

Posteriormente se ha descrito una hipersensibilidad ambiental³⁰⁴ a las radiaciones electromagnéticas en general, y no únicamente a las de radiofrecuencia, que darían origen al ya mencionado síndrome de hipersensibilidad electromagnética (SHEM), caracterizado principalmente, por la participación de los sistemas nervioso, epidérmico y oftálmico.

Entre los síntomas descritos que afectan al sistema nervioso en el hipotético síndrome, se cuentan la fatiga, estrés, insomnio y nerviosismo; en lo que atañe al sistema epidérmico se describe prurito, sensación de quemazón y erizamiento del vello en las extremidades; por último, e interesando al sistema oftálmico se apuntan: sensación de quemazón ocular, conjuntivitis y blefaritis. Como se puede observar, son síntomas altamente inespecíficos, por lo que resulta difícil demostrar su etiología o su patofisiología.³⁰⁵

Ello explica el que no se alcance un consenso a la hora de aceptar la existencia del supuesto síndrome, máxime teniendo en cuenta las conclusiones a que llegan otros estudios que refutan lo anterior, manteniendo la inexistencia de “hipersensibilidad” al campo electromagnético, que es achacada a percepciones

³⁰⁴ Una revisión general sobre numerosos factores ambientales que inducen una serie de síntomas inespecíficos agrupados bajo el nombre de “sensibilidades ambientales”, es aportada por el estudio de Joffres, M.R.; Williams, T.; Sabo, B.; y Fox, R.A., “Environmental sensitivities: Prevalence of major symptoms in a referral centre: The Nova Scotia Environmental Sensitivities: research Center Study”, *Environ. Health Perspect.*, 109, 2001: 161-171. A su vez Staudenmayer, H., *Environmental Illness*, Lewis Publishers, Washington D.C, 1999, señala en su libro diversas facetas sobre la hipersensibilidad electromagnética.

³⁰⁵ Ribas, B.; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M. y García Ferriz, P., “Some data on the comparison between eucariotic cell electric activity and the electromagnetic hypersensitivity syndrome”, *XIII Międzynarodowa Konferencja Neurokowo-Techniczna*, ELSAF, 1, 2001:148-155.

meramente subjetivas.³⁰⁶

En el capítulo siguiente se exponen, pormenorizadas, las conclusiones extractadas a tenor de los resultados obtenidos por nuestro estudio, y que justifican nuestra adhesión, como más adelante explicaremos, a las conclusiones del *Informe Técnico elaborado por el Comité de Expertos*, “Campos electromagnéticos y Salud Pública”, para la Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, Dirección General de Salud Pública y Consumo del Ministerio de Sanidad y Consumo.

V.3.- VALORACIÓN CRÍTICA

Una de las variables a tener en cuenta es la de las dosis de radiación, intencionadamente exageradas respecto a las existentes habitualmente en el medio, que hemos empleado en nuestros experimentos, tras constatar la inocuidad de dosis inferiores. No debemos olvidar que los campos electromagnéticos generados por las líneas de alta tensión, como en su momento indicamos, son de 50 Hz, presentando unos valores máximos, justo debajo de los sistemas conductores -y medidos a 1 metro de altura del suelo como indica la normativa internacional-, que oscilan entre 1 y 20 μ T para el campo magnético. Nuestro estudio, sin embargo, ha utilizado intensidades de campo del orden de

³⁰⁶ Andersson, B.; Berg, M.; Arnetz, B.B.; Melin, L.; Langlet, I. y Liden, S., “A cognitive-behavioural treatment of patients suffering from “electric hypersensitivity”. Subjective effects and reactions in a double-blind provocation study”, *J. Occup. Environ. Med.*, 38(8), Agosto, 1996: 752-758.

militeslas, que rebasan los valores de la frecuencia de exposición residencial en dos órdenes de magnitud.³⁰⁷

Se puede alegar, por supuesto, que no existe ningún agente ambiental que no presente algún tipo de efecto, deletéreo o no, a exposiciones muy por encima de las normales, como es el caso que nos ocupa. Aún más a nuestro favor, ya que hemos visto cómo, en los sistemas experimentales *in vitro*, no se observa efecto alguno a las altas dosis de radiación aplicadas, aparte de una ligera tendencia al aumento de la proliferación sin significación estadística, por lo que difícilmente tendrán efecto a las dosis ambientales. Únicamente aparecen efectos en el estudio de la BHE, aunque lo dicho en relación a las dosis empleadas es igualmente válido para este caso.

No obstante, estos indicios de algún tipo de repercusión biológica a dosis sensiblemente mayores que las presentes en el medio, son suficientes para recomendar la aplicación del “principio de precaución” mientras se continúa con la investigación de las consecuencias que para la salud pueda implicar la exposición a este tipo de contaminación ambiental, el umbral mínimo de radiación al que el cerebro reacciona, aumentando la permeabilidad de la BHE, así como los mecanismos que toman parte en dicha reacción.

³⁰⁷ Recordemos que nuestros ensayos se han llevado a la práctica con intensidades de campo magnético de 32, 64 y 96 G, que corresponden a intensidades de 3'2, 6'4 y 9'6 mT respectivamente.

Suscribimos, pues, en base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, lo dicho en las “Conclusiones” que, sobre el particular, desarrolla el *Informe Técnico elaborado por el Comité de Expertos*, “Campos electromagnéticos y Salud Pública”, para la Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, Dirección General de Salud Pública y Consumo del Ministerio de Sanidad y Consumo, con fecha de Mayo de 2001, al encontrarse nuestras apreciaciones en todo de acuerdo a las suyas, que resuelven (citando textualmente):

- *Existe una evidente preocupación social por los posibles efectos de los CEM sobre la salud pública³⁰⁸. Las autoridades sanitarias deben afrontar la responsabilidad de dar una respuesta rápida y transparente.*
- *El cumplimiento de la Recomendación del Consejo de Ministros de Sanidad de la Unión Europea relativa a la exposición del público en general a CEM de 0 Hz a 300 GHz³⁰⁹ es suficiente para garantizar la protección sanitaria de la población.*
- *A la luz de los conocimientos científicos actuales no puede afirmarse que la exposición a CEM dentro de los límites establecidos en la Recomendación del Consejo de Ministros de Sanidad de la Unión Europea produzca efectos peligrosos para la salud humana.*
- *La exposición a CEM por debajo de los niveles de la RCMSUE aunque pudiera inducir a alguna respuesta biológica en condiciones experimentales, no está demostrado que pueda implicar efectos nocivos para la salud. No disponemos de estudios epidemiológicos que evalúen los efectos nocivos a largo plazo sobre la salud derivados de la exposición al teléfono móvil o las antenas de telefonía móvil.*
- *No se ha llegado a establecer, de momento, un mecanismo biológico que explique una posible relación causal con exposición a CEM y alguna enfermedad.*

³⁰⁸ Véase, al respecto, el Anexo I de la presente tesis doctoral.

³⁰⁹ Documento incluido en el Apéndice Documental del Anexo II.

- *A pesar de la ausencia de efectos nocivos para la salud, por un principio de precaución, conviene fomentar el control sanitario y la vigilancia epidemiológica de la exposición con el fin de evaluar posibles efectos a medio y largo plazo de los CEM.*
- *A las potencias de emisión actuales y a las distancias establecidas en la RCMSUE en base a las evidencias científicas actuales, las antenas de telefonía móvil no parecen representar un peligro para la salud pública.*
- *Las evidencias actuales no indican asociación entre el uso de los teléfonos móviles y efectos nocivos para la salud.*

Por nuestra parte, nos parece oportuno recalcar una vez más la importancia de proseguir los estudios versados en materia de permeabilidad de la BHE bajo exposiciones crónicas y subcrónicas de animales a los efectos de CEM, ya que la actual base experimental sobre las consecuencias nocivas de las RNI es todavía limitada, existiendo en ella indicios que aconsejan prestar atención a posibles efectos de exposiciones a intensidades próximas a los límites recomendados. A fin de que la ausencia de evidencias se convierta en certeza y los campos electromagnéticos de frecuencia industrial puedan ser descartados definitivamente como agentes nocivos, todas las posibilidades de efectos perjudiciales deben ser exploradas y desechadas.

Condición indispensable para llegar a alcanzar la regulación y control de este tipo de contaminante ambiental es, pues, continuar con la profundización de nuestros conocimientos en la materia a través de investigaciones completas y rigurosas.

CONCLUSIONES

Como quiera que en el capítulo precedente hemos realizado un análisis detallado de los resultados, en el que constan las apreciaciones oportunas acerca de las diferentes etapas de nuestro trabajo, queda reflejada nuestra opinión en lo tocante a cada aspecto del mismo. Pero acaso sea conveniente recoger aquí, en algunas conclusiones, tanto las líneas generales de los efectos observados en los distintos sistemas a estudio, como los puntos principales en que se cifra nuestro criterio a la hora de afirmar, a la vista de los resultados obtenidos, que resulta imprescindible seguir profundizando en la investigación de los mecanismos implicados en los efectos biológicos de las radiaciones no ionizantes, sobre todo en lo que respecta a las variaciones observadas en la permeabilidad de la BHE imputables a la acción del campo magnético aplicado.

Remitiendo nuestras apreciaciones a la globalidad como marco de toda investigación, y dadas las múltiples interacciones posibles entre los elementos que intervienen en el problema, a la hora de valorar los resultados de los experimentos llevados a cabo en este estudio, es necesario tomar en consideración la convergencia y la suma en ellos de toda una serie de factores que son, por supuesto, separables, pero de los que se debe hacer un balance único. Esos factores constituyen un sistema complejo y no pueden, por tanto, ser analizados aisladamente si queremos percibir con exactitud la situación real; máxime cuando sus efectos combinados pueden ser superiores a la mera suma de ellos.

De cualquier manera, y partiendo siempre de la premisa inicial de que la interpretación de los resultados debe tener en cuenta evidencias que están más allá de los valores concretos reflejados en una gráfica, y ha de enmarcarse en las características de los grupos de estudio y las condiciones que rodean cada experimento, en base a nuestros ensayos llegamos a las siguientes

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- No se observa efecto de los campos magnéticos de frecuencia de 50 Hz, a las intensidades estudiadas de 3,2, y 6,4 mT, sobre la proliferación de sistemas celulares aislados sometidos a ellos durante un periodo de 92 horas, todo ello en base a nuestros ensayos.
- 2.- En las citadas condiciones, no se observa tampoco efecto alguno apreciable de este tipo de radiación sobre el material genético de las células estudiadas. Sin embargo, no nos hallamos en absoluto en condiciones de extrapolar estos resultados al caso de exposiciones crónicas de organismos vivos, en los que converge toda una serie de factores que constituyen sistemas altamente complejos, con una patente regulación homeostática inter-órganos.
- 3.- En el caso de la aplicación del campo magnético de 50 Hz a la intensidad de 9,6 mT se observa, como consecuencia del efecto térmico, una disminución en la proliferación celular de linfocitos humanos de sangre

CONCLUSIONES

periférica en cultivo, explicada por un aumento de la temperatura de la cámara por encima de los 37°C.

4.- Las concentraciones de metal que resultan citotóxicas al evaluar la proliferación celular de linfocitos humanos en cultivo, tanto en presencia como en ausencia del campo magnético de 50 Hz y a las intensidades aplicadas (3,2, 6,4 y 9,6 mT), son las de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M para el caso del hierro, y 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M para el plomo.

5.- No se observa sinergismo entre el efecto de un campo magnético de frecuencia de 50 Hz, a las intensidades utilizadas de 3,2, 6,4 y 9,6 mT, y la toxicidad celular del plomo y el hierro (cada uno por su parte) sobre la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo.

6.- En las condiciones apuntadas en el punto 1 (aplicación de un campo magnético de 50 Hz a las intensidades de 3,2, 6,4 y 9,6 mT), no se aprecia tampoco potenciación del efecto genotóxico de los mencionados iones hierro y plomo, en términos de micronúcleos, en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo; es decir, no se detectan efectos sinérgicos del campo magnético con el concurso de iones hierro o plomo.

7.- No se observa variación alguna en los parámetros enzimáticos y bioquímicos séricos de sangre humana sometida *in vitro* a la acción de un campo magnético de frecuencia 50 Hz a distintos tiempos de exposición

CONCLUSIONES

(6, 12, 24 y 48 horas) y a las intensidades de campo descritas (1'6, 3'2 y 6'4 mT).

8.- Se constata, *in vivo*, el efecto que un campo magnético de frecuencia extremadamente baja ejerce en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratones, sometidos a un campo magnético de 50 Hz y 27,5 Oe (2,75 mT), durante siete días, en el sentido de un aumento manifiesto de la citada permeabilidad.

9.- Se observa el establecimiento de sinergismo durante la exposición al campo magnético descrito con la administración simultánea de plomo, verificándose una potenciación del efecto permeabilizador de éste en presencia de la radiación apuntada de 50 Hz y 2,75 mT.

10.- Se aventura la hipótesis de que dichas radiaciones, mediante un aumento en las concentraciones de citokinas, activan las MMP en mayor o menor medida, de tal manera que la integridad de la BHE resulta comprometida por la degradación de la matriz extracelular que aquéllas llevan a cabo, por lo que deben ponerse en práctica los ensayos necesarios encaminados a probar dicha hipótesis.

11.- Se establecen, mediante irradiación con campos de radiofrecuencia (2,45 GHz), las propiedades dieléctricas de tejido pulmonar, hepático,

CONCLUSIONES

muscular, renal y pancreático de rata, estableciendo los valores de la conductividad y permitividad de cada uno de ellos.

12.- Al establecer las propiedades eléctricas (conductividad y permitividad) de los distintos tejidos de ratas mencionados, con sobrecarga orgánica de hierro y plomo mediante irradiación con campos magnéticos de radiofrecuencia (2,45 GHz), se evidencian cambios estadísticamente significativos en dichas propiedades tras la administración a los animales de los citados compuestos metálicos, cuya magnitud depende del metal administrado en cada caso y de los tejidos estudiados, de acuerdo al tipo de acumulación específica que la intoxicación con cada uno de los metales provoca:

12.a.- En el **tejido hepático**, la conductividad disminuye, tanto en el caso de sobrecarga orgánica de hierro, como en el de sobrecarga de plomo, respecto de los tejidos control.

En lo que se refiere a la permitividad, se percibe en ella un aumento importante respecto a los valores control, más acusado en el caso de intoxicación por plomo que en la de hierro, pero en ambos casos con significación estadística.

12.b.- En el **tejido pulmonar** se produce una disminución de la conductividad respecto a los tejidos del grupo control, tanto para los

grupos con sobrecarga de hierro como para los tratados con sobrecarga de plomo.

La permitividad, a su vez, presenta una disminución significativa en los tejidos de ratas tratadas con plomo y no varía en los del grupo tratado con hierro.

12.c.- En **tejido pancreático**, la conductividad disminuye respecto a los tejidos del grupo control, en ambos casos de sobrecarga orgánica de metal (hierro o plomo).

En lo tocante a la permitividad del tejido, ésta aumenta en ambos tipos de tratamiento metálico respecto a los valores proporcionados por los tejidos de las ratas control.

12.d.- El **tejido muscular**, en lo que respecta a su conductividad, se ve alterado por igual a causa de la sobrecarga orgánica de hierro y de plomo, dándose en ambos casos una disminución de esta propiedad eléctrica respecto a los valores control.

Asimismo, en el caso de la permitividad del tejido muscular, se observa un descenso en los valores de este parámetro respecto a los controles en ambos tipos de tratamiento con metal.

CONCLUSIONES

12.e.- En el **tejido renal**, la conductividad resulta menor en los órganos de ratas tratadas con los metales hierro y plomo, que en los de aquellas sin tratamiento alguno.

Por su parte, la permitividad de los tejidos renales estudiados, presenta asimismo una disminución en los casos de sobrecarga orgánica de hierro y plomo respecto a los valores de los tejidos del grupo control.

13.- Resulta indispensable proseguir con las investigaciones referentes a los efectos biológicos de los campos magnéticos, dado que las presentes conclusiones conciernen a mecanismos muy concretos, no siendo de aplicación en un contexto más amplio, por lo que quedan sujetas a ulteriores comprobaciones.

1. Aaron, R.K.; Ciombor, D.M.; Keeping, H.; Wang, S.; Capuano, A. y Polk, C., "Power frequency fields promote cell differentiation coincident with an increase in transforming growth factor-beta(1) expression", *Bioelectromagnetics*, 20(7), Octubre, 1999: 453-458.
2. Acworth, I.N. y Baily, B.B., *The Handbook of oxidative metabolism*, ESA Inc., 1995.
3. Adey, W. R., "Tissue interactions with non- ionizing electromagnetic fields", *Physiol. Rev.*, 61, 1981: 435- 514.
4. Adonaylo, V.N. y Oteiza, P.I., "Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain", *Toxicology*, 135 (2- 3), Julio, 1999: 77- 85.
5. Ahlbom, A., "Residential epidemiological studies", en: Matthes, R., Bernhardt, J.H. y Repacholi, M.H., eds. *Biological effects of static and ELF electric magnetic fields*, Oberschleissheim, Germany: ICNIRP Publication 4/97, 1997: 185-190.
6. Aisen, P., "Entry of iron into cells: a new role for the transferrin receptor in modulating iron release from transferrin". *Ann. Neurol.*, 32, 1992: 62- 68.
7. Akarsu, E.S.; House, R.V. y Coceani, F., "Formation of interleukin-6 in the brain of the febrile cat: relationship to interleukin-1", *Brain Res.*, 803 (1- 2), Agosto, 1998: 137-143.
8. Åkerstedt, T.; Arnetz, B.; Ficca, G.; Paulsson, L.E. y Kallner, A., "A 50-Hz electromagnetic field impairs sleep", *J. Sleep Res.*, 8(1), Marzo, 1999: 77-81.
9. Al-Omar, M.A.; Abbas, A.K. y Al-Obaidy, S.A., "Combined effect of exposure to lead and chlordane on the testicular tissues of Swiss mice", *Toxicol. Lett.*, 115, 2000: 1-8.
10. Al-Shuaib, W.B. et al., "Dehydration affects synaptic transmission at flexor muscle in acute lead- treated mice", *Cell. Mol. Biol. Noisy le grand*, 45 (4), Junio, 1999: 407- 411.
11. Alessio, L. et al., "Free erythrocyte protoporphyrin as an indicator of the biological effect of lead in adult males: I. Relationship between free erythrocyte protoporphyrin and indicators of internal dose of lead", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37, 1976: 73- 88.
12. Alphen, M. van, "Atmospheric heavy metal deposition plumes adjacent to a primary lead-zinc smelter" *Sci. Total Environ.* 236, 1999: 119- 134.

13. Alpuente, J. y Ramos, J.L., "Radiaciones no ionizantes en la vida cotidiana. Efectos y Protección", *Jornadas sobre Radiaciones No Ionizantes en Biología y Medicina*, Instituto Bioelectromagnetismo "Alonso de Santa Cruz". Editor: J.L. Bardasano, 1992.
14. Altpeter, E. S. et al., *BEW Publication Series, Study No. 55*, Berne, 1995: 155.
15. Andersson, B.; Berg, M.; Arnetz, B.B.; Melin, L.; Langlet, I. y Liden, S., "A cognitive-behavioural treatment of patients suffering from "electric hypersensitivity". Subjective effects and reactions in a double-blind provocation study", *J. Occup. Environ. Med.*, 38(8), Agosto, 1996: 752-758.
16. Andrews, N.C.; Fleming, M.D. y Gunshin, H., "Iron transport across biologic membranes", *Nutr. Rev.*, 57, ISS 4, 1999: 114-123.
17. Aoki, H.; Yamazaki, H.; Yoshino, T. y Akagi, T., "Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line", *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 69(1), Julio, 1990: 103-106.
18. Ariza, M.E. y Williams, M.V., "Lead and mercury mutagenesis: type of mutation dependent upon metal concentration", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 13 (2), 1999: 107-112.
19. Armes, G.T. et al., "Lead activates nuclear transcription factor- kappa B, activator protein-1, and amino- terminal C- Jun kinase in pheochromocytoma cells", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 155 (3), Marzo, 1999: 280- 286.
20. Aschner, M., "Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes", *Toxicol. Lett.*, 102-103, Diciembre, 1998: 283-287.
21. Bachert, C., "Histamine: a major role in allergy?", *Clin. Exp. Allergy*, 28 (Supl. 6), Diciembre, 1998: 15-19.
22. Baranowska-Bosiacka, I.; Hlynczak, A.J. y Machalinski, B., "The impact of lead ions on metabolism of erythrocytes", *Med. Pr.*, 51, 2000: 59-65.
23. Barker, A.T. y Lunt, M.J., "The effects of pulsed magnetic fields of the type used in the stimulation of bone fracture healing", *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, 4(1), Febrero, 1983: 1-27.
24. Barnothy, M.F. y Barnothy, J.M., "Magnetic fields and the number of blood platelets", *Nature*, 225(238), Marzo, 1970: 1146-1147.

25. Baselt, R.C., "Disposition of toxic drugs and chemicals in man", *Biomedical Publ.*, Davis, Cal., USA, 2ª ed., 1982; Wirth, W.; Hacht, G. y Gloxuber, C., *Toxikologie Fibel*, 2ª ed. Thieme, Stuttgart, 1971.
26. Bauchinger, M.; Hauf, R.; Schmid, E. y Drisp, J., "Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380kV systems", *Radiat. Environ. Biophys.*, 19, 1981:235-238.
27. Bauchinger, M., "Cytogenetic effects in human lymphocytes as a dosimetry system", en: Eisert, W.S.; Mendelsohn, M.L., eds., *Biological dosimetry: Cytometric approaches to mammalian systems*. Berlin, Springer- Verlag, 1984: 15-24.
28. Bennet, W.R. "Cancer and power lines", *Phys. Today*, Abril, 1994: 23-29.
29. Bernardt, J.H. y Vogel, E., "Biophysical interactions mechanisms", en: *Matthes. Non ionising Radiation. Proceedings of the 3 workshop*, Baden, Austria, ICNIRP, 22-26 Abril, 1996: 239-244.
30. Bernhardt, J., "The direct influence of electromagnetic fields on nerve and muscle cells of man within the frequency range of 1 Hz to 30 MHz", *Radiat. Environ. Biophys.*, 16(4), 1979: 309-323.
31. Bezkorovainy, A. y Rafelson, M.E. Jr., *Concise biochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
32. Birnboim, H.C., "DNA strand breakage in human leukocytes exposed to a tumour promoter, phorbol myristate acetate", *Science*, 215, 1982: 1247-1249.
33. Blundell, T.L., "Structure- based drug design", *Nature*, 384 (Suppl. 7), 1996: 23-26.
34. Boado, R.J.; Li, J.Y.; Nagaya, M.; Zhang, C. y Pardridge, W.M., "Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood- brain barrier", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(21), Octubre, 1999: 12079-12084.
35. Bonkovsky, H.L., "Iron and the liver", *Am. J. Med. Sci.*, 301, 1991: 32- 43.
36. Boorman, G.A.; Gauger, J.R.; Johnson, T.R.; Tomlinson, M.J.; Findlay, J.C.; Travlos, G.S. y McCormick, L.; "Eight-week toxicity study of 60 Hz magnetic fields in F344 rats and B6C3F1 mice", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 35(1), Enero, 1997: 55-63.

37. Braganza, L.F.; Blott, B.H.; Coe, T.J. y Melville, D., "The superdiamagnetic effect of magnetic fields on one and two component multilamellar liposomes", *Biochim. Biophys. Acta.*, 801(1), Septiembre, 1984: 66-75.
38. Braun, U.; Pusterla, N. y Ossent, P., "Lead poisoning of calves pastured in the target area of a military shooting range", *Schweiz. Arch. Tierheilkd*, 139, 1997: 403-407.
39. Brent, R.L., "Reproductive and teratologic effects of low frequency electromagnetic fields: a review of in vivo and in vitro studies using animal models", *Teratology*, 59(4), Abril, 1999: 261-286.
40. Bruce, G.K.; Howlett, C.R. y Huckstep, R.L., "Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius. Preliminary results", *Clin. Orthop.*, (222), Septiembre, 1987: 300-306.
41. Buja, L.M. y Roberts, W.C., "Iron and the Heart", *Am. J. Med.*, 51, 1971: 209- 221.
42. Burch, J.B.; Reif, J.S.; Yost, M.G.; Keefe, T.J. y Pitrat, C.A., "Reduced excretion of a melatonin metabolite in workers exposed to 60 Hz magnetic fields", *Am. J. Epidemiol.*, 150(1), Julio, 1999: 27-36.
43. Burchard, J.F.; Nguyen, D.H.; Richard, L.; Young, S.N.; Heyes, M.P. y Block, E., "Effects of electromagnetic fields on the levels of biogenic amine metabolites, quinolinic acid, and beta-endorphin in the cerebrospinal fluid of dairy cows", *Neurochem. Res.*, 23(12), Diciembre, 1998: 1527-1531.
44. Byus, C.V.; Lundak, R.L.; Fletcher, R.M. y Adey, W.R., "Alterations in kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields", *Bioelectromagnetics*, 5, 1984: 341-351.
45. Byus, C. V.; Kartum, K.; Pieper, S. y Adey, W.R., "Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low-energy modulated microwave fields and phorbol ester tumour promoters", *Cancer Res.*, 48, 1988: 4222- 4226.
46. Cain, C.D.; Thomas, D.L. y Adey, W.R., "Focus formation of C3H/10T1/2 cells and exposure to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field", *Bioelectromagnetics*, 18(3), 1997: 237-243.
47. Callender, S.T. y Weatherall, D.J., "Iron quelation with oral desferrioxamine", *Lancet*, II, 1980: 689- 691.

48. Carrascal Marino, E., *Histología I*, ("Acta Salmanticensia. Biblioteca de la Salud; 37; 38"), 2ª ed., Salamanca: Universidad de Salamanca, 1991, 446-449.
49. Carson, J.J.; Prato, F.S.; Drost, D.J.; Diesbourg, L.D. y Dixon, S.J., "Time-varying magnetic fields increase cytosolic free Ca^{2+} in HL-60 cells", *Am. J. Physiol.*, 259(4 Pt 1), Octubre, 1990: C687-692.
50. Casarett, L.J., *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisoning*, 2º ed., Macmillan, New York, USA, Doull, J.; Klaassen, C.D. y Amdur, M.O., eds., 1982.
51. Cerny, R., "The biological effects of implanted magnetic fields. Part 1. Mammalian blood cells", *Aust. Orthod. J.*, 6(2), Octubre, 1979: 64-70.
52. Clark, M.R. et al., "Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells", *J. Clin. Invest.*, 65, 1980: 189- 196.
53. Cleary, S.F., "Effects of radio- frequency radiation on mammalian cells and biomolecules *in vitro*", en: Blank, M., ed., *Electromagnetic fields: biological interactions and mechanisms*, Washington: American Chemical Society, 1995: 467- 477.
54. Clothier, B.; Robinson, S.; Akhtar, R.A.; Francis, J.E.; Peters, T.J.; Raja, K. y Smith, A.G., "Genetic variation of basal iron status, ferritin and iron regulatory protein in mice: potential for modulation of oxidative stress", *Biochem. Pharmacol.*, 59, ISS 2, 2000: 115-122.
55. Cohen, M.M.; Kunska, A.; Astemborski, J.A.; McCulloch, D. y Paskewitz, D.A., "Effect of low-level, 60Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells: I. Mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes", *Bioelectromagnetics*, 7, 1991: 415-423.
56. Cohen, O.; Zylber-Katz, E.; Caraco, Y.; Granit, L. y Levy, M., "Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyrrone metabolites after a single oral dose of dipyrrone", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 54(7), Septiembre, 1998: 549-553.
57. Corbett, J.D., "Band 3 and glycoporphyrin are progressively aggregated in density- fractionated sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies", *J. Clin. Invest.*, 91, 1993: 208-217.
58. Cossarizza, A.; Monti, D.; Bersani, F.; Cantini, M.; Cadossi, R.; Sacchi, A. y Franceschi, C., "Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160(2), Abril, 1989: 692-698.

59. Cossarizza, A.; Angioni, S.; Petraglia, F.; Genazzani, A.R.; Monti, D.; Capri, M.; Versan, F.; Cadossi, R. y Franceschi, C., "Exposure to low frequency pulsed electromagnetic fields increases interleukin-1 and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells", *Exp. Cell. Res.*, 204(2), Febrero, 1993: 385-387.
60. Coussement, W., en: *Toxicology, Principles and applications*, Niesink, R.J.M.; De Vries, J. y Hollinger, M.A., eds., CRC Inc. and Open University of the Netherlands, Boca Raton, USA, 1996.
61. Cremin, J.D. Jr.; Luck, M.L.; Laughlin, N.K. y Smith, D.R., "Efficacy of succimer chelation for reducing brain lead in a primate model of human lead exposure", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 161, 1999: 283- 293.
62. Crichton, R. y Ward, R., "Iron metabolism in health and disease", *The Biochemist*, Agosto/Septiembre, 1996: 12- 17.
63. Cridland, N.A., *Electromagnetic fields and cancer: A review of relevant cellular studies*. Report of the National Radiological Protection Board, United Kingdom, NRPB-R256, 1993.
64. Czerska, E. M.; Elson, E.C.; Davis, C.C.; Swicord, M.L. y Czerski, "Effects of continuous and pulsed 2450 MHz radiation exposure on spontaneous transformation of human lymphocytes in vitro", *Bioelectromagnetics*, 13, 1992: 247- 259.
65. Chandra, A.M.; Campbell, G.A.; Reddy, G. y Qualls, C.W. Jr., "Neurotoxicity of 1,3,5-trinitrobenzene (TNB): immunohistochemical study of cerebrovascular permeability", *Vet. Pathol.*, 36(3), Mayo, 1999: 212-220.
66. Chen, G.; Upham, B.L.; Sun, W.; Chang, C.C.; Rithwell, E.J.; Chen, K.M.; Yamasaki, H. y Trosko, J.E., "Effect of electromagnetic field exposures on chemically induced differentiation of friend erytroleukemia cells", *Environ. Health. Perspect.*, 108, Octubre, 2000: 967-972.
67. Chen, H.H. et al., "Protein kinase C in rat brain is altered by developmental lead exposure", *Neurochem. Res.*, 24 (3), Marzo, 1999: 415- 421.
68. Cherkasov, G.V., "State of erythrocytes after long-term exposure to magnetic field", *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.*, 17(5), Septiembre, 1983: 72-75.

69. Chiabrera, A. et al., "Recent advances in biophysical modelling of radio frequency electromagnetic field interactions with living systems", en: *Proceedings of the wireless Technology Research. State of the science colloquium*, Roma, Noviembre, 1995: 13-15.
70. Chiles, C.; Hawrot, E.; Gore, J. y Byck, R., "Magnetic field modulation of receptor binding", *Magn. Reson. Med.*, 10(2), Mayo, 1989: 241-245.
71. Chisolm, J.J. Jr., *Mod. Treat.*, 8 (3), Harper and Row, eds., Agosto, 1971.
72. Chisolm, J. J. Jr., "Heme Metabolites in Blood and Urine in Relation to Lead Toxicity and their determination ", en: *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 20, Academy Press, ed. 1978: 238.
73. Chisolm, J.J. Jr., "Safety and efficacy of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) in children with elevated blood lead concentrations" *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*; 38, 2000: 365- 375.
74. Chizhenkova, R.A. y Safroskina, A.A., "Electrical reactions of brain to microwave irradiation", *Electro- Magnetobiology* ,15, 1996: 253-258.
75. Chou, C.K.; Bassen, H.; Osepchuk, J.; Balzano, Q.; Petersen, R.; Meltz, M.; Cleveland, R.; Lin, J.C. y Heynick, L., "Radio frequency electromagnetic exposure: tutorial review on experimental dosimetry", *Bioelectromagnetics*, 17(3), 1996: 195-208.
76. Chou, C.K.; Guy, A.W.; Kunz, L.L.; Johnson, R.B.; Crowley, J.J. y Krupp, J.H., "Long-term, low-level microwave irradiation of rats", *Bioelectromagnetics*, 13(6), 1992: 469-496.
77. Dacha, M.; Accorsi, A.; Pierotti, C.; Vetrano, F.; Mantovani, R.; Guidi, G.; Conti, R. y Nicolini, P., "Studies on the possible biological effects of 50 Hz electric and/or magnetic fields: evaluation of some glycolytic enzymes, glycolytic flux, energy and oxide-reductive potentials in human erythrocytes exposed in vitro to power frequency fields", *Bioelectromagnetics.*, 14(4), 1993: 383-391.
78. D'Agostini, F.; Izzotti, A. y De Flora, S., "Induction of micronuclei in cultured human lymphocytes exposed to quartz halogen lamps and its prevention by glass covers", *Mutagenesis*, 8, 1993: 87-89.
79. Davanipour, Z.; Sobel, E.; Bowman, J.D.; Qian, Z. y Will, A.D., "Amyotrophic lateral sclerosis and occupational exposure to electromagnetic fields", *Bioelectromagnetics*, 18(1), 1997: 28-35.
80. Dawson, E.B. et al., "The effect of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers", *J. Am. Coll. Nutr.*, 18 (2), Abril, 1999: 166- 170.

81. Delville, Y., "Exposure to lead during development alters aggressive behaviour in golden hamsters", *Neurotoxicol. Teratol.*, 21 (4), Julio-Agosto, 1999: 445- 449.
82. Denk, W.; Holt, J.R.; Shepherd, G.M.G. y Corey, D.P., "Calcium imaging of single stereocilia in hair cells: localization of transduction channels at both ends of tip links", *Neuron.*, 15(6), Diciembre, 1995: 1311-1321.
83. Desjobert, H.; Hillion, J.; Adolphe, M.; Averiant, G y Nafziger, J., "Effects of 50 Hz magnetic fields on C-myc transcript levels in nonsynchronized and synchronized human cells", *Bioelectromagnetics*, 16(5), 1995: 277-283.
84. Díaz González, M., et al., "Estudio epidemiológico de niveles de plomo y otros parámetros en una población infantil urbana industrial y su comparación con la de una zona rural", *Salud y trabajo*, 33, Octubre, 1981: 96- 102.
85. Díaz- Rubio, M. y Espinós, D., *Tratado de Medicina Interna*, Ed. Panamericana; 1, 1992: 880- 887.
86. Dillner-Centerlind, M.L.; Hellstrom, U.; Robertsson, E.S.; Hammerstrom, S. y Perlmann, P., "Mitogenic responsiveness of human T-lymphocyte subpopulations: regulation by suppressive Fc-receptor-bearing T cells and influence of fractionation procedures", *Scand. J. Immunol.*, 12(1), 1980: 13-21.
87. Dillner-Centerlind, M.L. et al., *J. Immunol.*, 10, 1980: 434-442.
88. Ding, Y.; Gonick, H.C. y Vaziri, N.D., "Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells", *Am. J. Hypertens.*; 13, 2000: 552-555.
89. Dizdaroglu, M. et al., "Damage to the bases in mammalian chromation by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions", *Arch. Biochem. Biophys.*, 285, 1991: 317- 324.
90. Dolk, H.; Elliott, P.; Shaddick, G.; Walls, P. y Thakrar, B., "Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. I. Sutton Coldfield transmitter", *Am. J. Epidemiol.*, 145(1), Enero, 1997: 1-9.
91. Dolk, H.; Elliott, P.; Shaddick, G.; Walls, P. y Thakrar, B., "Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain. II. All high power transmitters", *Am. J. Epidemiol.*, 145(1), Enero, 1997: 10-17.

92. Duck, F.A., *Physical properties of tissue: A comprehensive reference book*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1990.
93. Dunscombe, P.B.; Gammampila, K. y Ramsey, N.W., "A search for nonthermal effects of 434 MHz microwave radiation on whole human blood", *Radiat. Res.*, 96(2), Noviembre, 1983: 235-250.
94. El-Missiry, M.A., "Prophylactic effect of melatonin on lead- induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant systems in male rats", *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 14 (1), 2000: 57- 62.
95. Ercal, N.; Neal, R.; Treeratphan, P.; Lutz, P.M.; Hammond, T.C.; Dennerly, P.A. y Spitz, D.R., "A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 39, 2000: 251- 256.
96. Erlich, R. et al., *Electricity and magnetism simulations. [developed by] the Consortium for Upper- Level Physics software*, New York: John Wiley & sons, 1995.
97. Fardon, J.C.; Poydock, M.E. y Basulto, G., "Effect of magnetic fields on the respiration of malignant, embryonic and adult tissue", *Nature*, 211(47), Julio, 1966: 433.
98. Farell, S.E. et al., "Blood lead levels in emergency department patients with retained lead bullets and shrapnel", *Acad. Emerg. Med.*, 6 (3), Marzo, 1999: 208- 212.
99. Farndale, R.W.; Maroudas, A. y Marsland, T.P., "Effects of low-amplitude pulsed magnetic fields on cellular ion transport", *Bioelectromagnetics.*, 8(2), 1987: 119-134.
100. Fenech, M. y Morley, A.A., "Measurement of micronuclei in lymphocytes", *Mutat. Res.*, 147(1-2), Febrero-Abril, 1985: 29-36.
101. Fenech, M. y Morley, A.A., "Cytokinesis block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation", *Mut. Res.*, 161, 1986: 193-298.
102. Fenech, M., "The cytokinesis- block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.*, 285, 1993: 35-44.
103. Fernández Ipar, A. y Pérez Calvo, M., "Estimación de tasas de acumulación de productos químicos en vertebrados acuáticos". *BIO, Colegio Oficial de Biólogos*, 13, Abril, 1998: 14-16.

104. Ferreira, G.C.; Franco, R.; Lloyd, S.G.; Moura, J.J. y Huynh, B.H., "Structure and function of ferrochelatase", *J. Bioenerg. Biomembr.*, 27 (2), Abril, 1995: 221-229.
105. Feychting, M. y Ahlbom, A., "Magnetic fields and cancer in people residing near swedish high-voltage power lines", JMM. Report 8/92 Karolinska Institut, Stockholm, Sweden, 1992; y *Am. J. Epidemiol.*, 1993: 138- 467.
106. Feychting, M. y Ahlbom, A., "Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines", *Am. J. Epidemiol.*, 138, 1993: 467-481.
107. Feychting, M.; Pedersen, N.L.; Svedberg, P.; Floderus, B. y Gatz, M., "Dementia and occupational exposure to magnetic fields", *Scand. J. Work Environ. Health*, 24(1), Febrero, 1998: 46-53.
108. Fields, M. y Lewis, C.G., "The interaction between dietary copper and excess in iron increases risk of heart disease" USDA, Beltsville Human Nutrition Research Center, Beltsville, MD 20705 USA; en: *Abstracts of 10th Intern. Symposium on trace Elem. in Man and Animal, TEMA 10*, Mayo, 1999: 7.
109. Fiorani, M.; Biagiarelli, B.; Vetrano, F.; Guidi, G.; Dacha, M. y Stocchi, V., "In vitro effects of 50 Hz magnetic fields on oxidatively damaged rabbit red blood cells", *Bioelectromagnetics.*, 18(2), 1997: 125-131.
110. Fischer, H.; Gottschlich, R. y Seelig, A., "Blood- brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion", *J. Membr. Biol.*, 165(3), Octubre, 1998: 201-211.
111. Fisher, N.C. y Daggett, P.R., "Haemochromatosis presenting with loss of libido and impotence". *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8, 1996: 705-707.
112. Flanagan, P.R., "Intestinal iron absorption and metabolism", en: *Iron transport and storage*, Ponka, P.; Schulman, H.M. y Woodworth, R.C., eds., CRC, Boca Raton, 1990: 247- 261.
113. Fleming, R.E.; Migas, M.C.; Holden, C.C.; Waheed, A.; Britton, R.S.; Tomatsu, S.; Bacon, B.R. y Sly, W.S., "Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary haemochromatosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, ISS 5, 2000: 2214-2219.
114. Floderus, B.; Persson, T.; Stenhund, C.; Wennberg, A.; Ost, A. y Knave, B., "Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukaemia and brain tumours. Case-control study in Sweden", *Cancer causes Control*, 4, 1993: 465-476.

115. Floderus, B.; Tornquist, S. y Stenlund, C., "Incidence of selected cancers in Swedish railway workers, 1961-79", *Cancer Causes Control*, 5(2), Marzo, 1994: 189-194.
116. Flora, G.J. y Seth, P.K., "Beneficial effects of S- adenosyl- L- methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione and lipid peroxidation during acute lead- ethanol administration in mice", *Alcohol.*, 18 (2- 3), Junio- Julio, 1999: 103- 108.
117. Flora, G.J. et al., "Changes in neurotransmitter receptors and neurobehavioral variables in rats co- exposed to lead and ethanol", *Toxicol. Lett.*, 109 (1-2), Septiembre, 1999: 43- 49.
118. Florez, J.; Armijo, J.A. y Mediavilla, A., "Procesos de distribución y excreción de los fármacos", en: *Compendio de farmacología humana*, Jesús Flórez, Pamplona: EUNSA, D.L., 1980, 55-57.
119. Foote, R.H., "Fertility of rabbit sperm exposed in vitro to cadmium and lead", *Reprod. Toxicol.* 13, 1999: 443-449.
120. Foster, K.R. y Schwan, H.P., "Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review", *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 17(1), 1989: 25-104.
121. Frei, M.R.; Jauchem, J.R.; Dusch, S.J.; Merritt, J.H.; Berger, R.E. y Stedham, M.A., "Chronic, low-level (1.0 W/kg) exposure of mice prone to mammary cancer to 2450 MHz microwaves", *Radiat. Res.*, 150(5), Noviembre, 1998: 568-576.
122. Frey, A.H., "Headaches from cellular telephones: are they real and what are the implications?", *Environ. Health Perspect.*, 106(3), Marzo, 1998: 101-103.
123. Freyssinet, J.M.; Torbet, J. y Hudry-Clergeon, G., "Fibrinogen and fibrin in strong magnetic fields. Complementary results and discussion", *Biochimie.*, 66(2), Febrero, 1984: 81-85.
124. Friedman, H.; Becker, R.O. y Bachman, C.H., "Effect of magnetic fields on reaction time performance", *Nature*, 213(79), Marzo, 1967: 949-950.
125. Fulton, J.P.; Cobb, S.; Preble, L.; Leone, L. y Foman, E., "Electrical wiring configurations and childhood leukaemia in Rhode-Islands", *Am. J. Epidemiol.*, 111, 1980: 292-296.
126. Funch, D.P.; Rothman, K.J.; Loughlin, J.E. y Dreyer, N.A., "Utility of telephone company records for epidemiologic studies of cellular telephones" *Epidemiology*, 7(3), Mayo, 1996: 299-302.

127. Gabriel, C. y Gabriel, S., *Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF & Microwave Frequencies*, King's College, Londres, AL/OE-TR-1996-0037, 1996.
128. Gaillard, R.C., "Cytokines in the neuroendocrine system", *Int. Rev. Immunol.*, 17(1-4), 1998: 181-216.
129. Gantenberg, H.W.; Wuttke, K.; Streffer, C. y Muller, W.U., "Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo", *Radiat. Res.*, 128(3), Diciembre, 1991: 276-281.
130. Garaj- Vrhoac, V.; Fucic, A. y Horvat, D., "The correlation between the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation in vivo", *Mutat. Res.*, 281, 1992: 181-186.
131. Garber, H.J.; Oldendorf, W.H.; Braun, L.D. y Lufkin, R.B., "MRI gradient fields increase brain nannitol space", *Magn. Reson. Imaging.* 7 (6), 1989: 605-610.
132. García Arribas, M. Pérez Calvo y B. Ribas Ozonas, "Detección de la exposición al plomo mediante análisis de metalotioneína hepática por electroforesis capilar". *An. Real Acad. Farm.*, 64 (4), Diciembre ,1998: 599-614.
133. García Arribas, O.; Pérez Calvo, M.; Nuñez García, M.; Sebastián, J.L.; Martínez, G.; Rodríguez, L.P. und Ribas Ozonas, B., "Proliferation und Mikronucleus in peripheren menschlichen Lymphocyten in Gegenwart von Kadmium im ELF-Magnetfeld", *Mengen und Spurenelemente*, 1, en: M. Anke, W. Arnhold, et al. (eds.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, Alemania, 1998: 9-16.
134. García Arribas, O.; Pérez Calvo, M. y Ribas Ozonas, B., "Electroforesis capilar de metalotioneína en hígado de mamífero como proteína bioindicadora de la contaminación ambiental por residuos metálicos", *Actas, V Congreso Internacional de Química de la ANQUE*, (II), 1999: 347-356.
135. García Arribas, O.; Pérez Calvo, M.; Sebastián, J.L.; Muñoz San Martín, S.; Sancho, M.; Miranda, J.M.; Rodríguez, L.P.; Escribano, J.M. y Ribas, B., "Efecto del cadmio, plomo y mercurio sobre la permitividad y conductividad eléctrica a frecuencias de microondas", en: J.L. Bardasano ed., *Instituto Bioelectromagnetismo Alonso de Santa Cruz*, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, 1999.

136. O. García Arribas, M. Pérez Calvo, J. L. Sebastián, S. Muñoz, M. Sancho, J. M. Miranda, J. M. Escribano, L. P. Rodríguez, B. Ribas., "Effects of heavy metals on dielectrical properties of tissues at microwave frequencies", *Metal Ions in Biology and Medicine*, 6, en: John Libbey Eurotext, Paris, France, 2000: 147-149.
137. García Sagredo, J.M., Parada, L.A. y Monteagudo, J.L., "Effect on SCE in human chromosomes in vitro of low level pulsed magnetic fields", *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 1990: 185-188.
138. García Sagredo, J.M., "Performance of semiautomatic system for chromosome analysis in scoring aberrations. Application to analyze the effect of low-level 50 Hz electromagnetic fields on human chromosomes in vitro", en: *Advances in Analytical Cellular Pathology*, G. Burger, M. Oberholzer y G. Peter Voijs, eds. Excerpta Medica, Amsterdam, 1990: 65-66.
139. García Sagredo, J.M. y Monteagudo, J.L., "Effect of low level pulsed electromagnetic fields in human chromosomes in vitro: analysis of chromosomal aberrations", *Heredity.*, 115, 1991: 9-11.
140. Gasche, Y.; Fujimura, M.; Morita-Fujimura, Y.; Copin, J.C.; Kawase, M.; Massengale, J. y Chan, P.H., "Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood- brain barrier dysfunction", *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 19(9), Septiembre, 1999: 1020-1028.
141. Geddes, L.A. y Baker, L.E., "The specific resistance of biological material. A compendium of data for the biomedical engineer and physiologist", *Med. And Biol. Engin.*, 5, 1967: 271-293.
142. Gilbert, M.E. et al., "The influence of developmental period of lead exposure on long- term potentiation in the adult rat dentate gyrus in vivo", *Neurotoxicology*, 20 (1), Febrero, 1999: 57- 69.
143. Gisselsson, L.; Smith, M.L. y Siesjo, B.K., "Influence of hypoglycaemic coma on brain water and osmolality", *Exp. Brain Res.*, 120(4), Junio, 1998: 461-469.
144. Goodman, E.M.; Sharpe, P.T.; Greenebaum, B. y Marron, M.T., "Pulsed magnetic fields alter the cell surface", *FEBS. Lett.*, 199(2), Abril, 1986: 275-278.
145. Gorczynska, E. y Wegrzynowicz, R., "The effect of magnetic fields on platelets, blood coagulation and fibrinolysis in guinea pigs", *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 15(6), 1983: 459-468.

146. Gorczynska, E. y Wegrzynowicz, R., "Effect of chronic exposure to static magnetic field upon the K⁺, Na⁺ and chlorides concentrations in the serum of guinea pigs", *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 30(2), 1986: 121-126.
147. Goyer, R.A., "Toxic effects of metals", en: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 3^a ed., C. D. Klaassen, M.O. Amdor, J. Doull, MacMillan, eds., NY, 1986: 582-635.
148. Graham, C.; Cook, M.R.; Riffle, D.W.; Gerkovich, M.M. y Cohen, H.D., "Nocturnal melatonin levels in human volunteers exposed to intermittent 60 Hz magnetic fields", *Bioelectromagnetics*, 17(4), 1996: 263-273.
149. Graham et al., *Bioelectromagnetics*, 18, 1996b: 166.
150. Granick, J. L. et al., "Studies in lead poisoning II. Correlation between the ratio of activated to inactivated delta- aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead level", *Biochem. Med.*, 8, 1973: 149-159.
151. Greenland, S., "Estimation of population attributable fractions from fitted incidence ratios and exposure survey data, with an application to electromagnetic fields and childhood leukaemia", *Biometrics*, 57(1), Marzo, 2001: 182-188.
152. Griffin, G.D.; Khalaf, W.; Hayden, K.E.; Miller, E.J. y Dowray, V.R.; Creekmore, A.L.; Carruthers, C.W.; Williams, M.W. y Gailey, P.C., "Power frequency magnetic field exposure and GAP junctional communication in Clone 9 cells", *Bioelectrochem.*, 51(2), Junio, 2000: 117-123.
153. Guénel, P.; Raskmark, R.; Anderson, J.B. y Lynge, E., "Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark", *Brit. J. Industr. Med.*, 50, 1993: 758-764.
154. Gupta, A.; Nigam, D.; Shuckla, G.S. y Agarwal, A.K., "Effect of pyrethroid-based liquid mosquito repellent inhalation on the blood- brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats", *J. Appl. Toxicol.*, 19(1), Enero-Febrero, 1999: 67-72.
155. Gurer, H. et al., "Antioxidant role of alpha- lipoic acid in lead toxicity", *Free Radic. Biol. Med.*, 27 (1-2), Julio, 1999: 75- 81.
156. Gutteridge, J.M.C. et al, "Superoxide- dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts", *Biochem. J.*, 199, 1981: 263- 265.

157. Guy, A.W., en: Klauenberg et al., eds.: "RF Radiat Standards", *Biol. Effects, Dosimetry, Epidem. And Public Health*, Plenum Press, NATO ASI Series A, 274, 1994: 311- 326.
158. Guyton, A. C., *Anatomía y fisiología del sistema nervioso: neurociencia básica*, Arthur C. Guyton, 2ª ed. (3ª reimp.), Buenos Aires: Panamericana, 1997: 175-717.
159. Halle, B., "On the cyclotron resonance mechanism for magnetic field effects on transmembrane ion conductivity", *Bioelectromagnetics.*, 9(4), 1988: 381-385.
160. Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C., "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", *Methods. Enzymol.*, 186, 1990: 1-85.
161. Hammerström, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 1982: 1611-1615.
162. Hamoutene, D.; Rahimtula, A. y Payne, J., "Iron ore mines leachate potential for oxyradical production", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, ISS 2, 2000: 218-224.
163. Han, C.; Wu, G.; Yin, Y. Y Shen, M., "Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity on cadmium chloride in various genotoxicity assays", *Food Chem. Toxicol.*, 30, 1992: 521-524.
164. Hardell, L.; Nasman, A.; Pahlson, A.; Hallquist, A. y Hansson-Mild, K., "Use of cellular telephones and the risk for brain tumours: A case-control study", *Int. J. Oncol.*, 15(1), Julio, 1999: 113-116.
165. Hartwig et al., "Indirect mechanism of lead- induced genotoxicity in cultured mammalian cells", *Mutat. Res.*, 241, 1990: 75- 82.
166. Hill, G.M.; Link, J.E.; Meyer, L. y Fritsche, K.L., "Effect of vitamin E and selenium on iron utilization in neonatal pigs", *J. Anim. Sci.*, 77, ISS 7, 1999: 1762-1768.
167. Hippel (von), A.R., *Dielectrics and waves*, Cambridge, Mass.: The MIT Press, 1996.
168. Hocking, B.; Gordon, I.R.; Grain, H.L. y Hatfield, G.E., "Cancer incidence and mortality and proximity to TV towers", *Med. J. Aust.*, 165(11-12), Diciembre, 1996: 601-605. (Fe de erratas publicada en: *Med. J. Aust.*, 166(2), Enero, 1997:80).
169. Hocking, B., "Microwave sickness: a reappraisal", *Occup. Med. Oxford*, 51(1), Febrero, 2001: 66-69.

170. Houston, D.K. y Johnson, M.A., "Does vitamin C intake protect against lead toxicity?", *Nutr. Rev.*, 58, 2000: 73- 75.
171. Huang, F.P.; Zhou, L.F. y Yang, G.Y., "The effect of extending mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat", *Neurol. Res.*, 20(1), Enero, 1998: 57-62.
172. Hulka, B.S. y Moorman, P.G., "Breast cancer: hormones and other risk factors", *Maturitas*, 38(1), Febrero, 2001: 103-113.
173. Imaida, K.; Taki, M.; Yamaguchi, T.; Ito, T.; Watanabe, S.; Wake, K.; Aimoto, A.; Kamimura, Y.; Ito, N. y Shirai, T., "Lack of promoting effects of the electromagnetic near-field used for cellular phones (929.2 MHz) on rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay", *Carcinogenesis*, 19(2), Febrero, 1998: 311-314.
174. Imaida, K.; Taki, M.; Watanabe, S.; Kamimura, Y.; Ito, T.; Yamaguchi, T.; Ito, N. y Shirai, T., "The 1.5 GHz electromagnetic near-field used for cellular phones does not promote rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay", *Jpn. J. Cancer. Res.*, 89(10), Octubre, 1998: 995-1002.
175. Izrael, M., "Changes in arterial elasticity after high-frequency electromagnetic field irradiation", *Probl. Khig.*, 5, 1980: 22-27.
176. Jacobson, J.I., "Is the fusion process the basis for growth, repair and aging?", *Panminerva. Med.*, 32(3), Julio-Septiembre, 1990: 132-140.
177. Jadhav, A.L.; Ramesh, G.T. y Gunasekar, P.G., "Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb²⁺-induced cytotoxicity", *Toxicol. Lett.*, 115, 2000: 89-98.
178. Jarrar, B.M. y Mahmoud, Z.N., "Histochemical demonstration of changes in the activity of hepatic phosphatases induced by experimental lead poisoning in male white rats (*Rattus norvegicus*)", *Toxicol. Ind. Health*; 16, 2000: 7-15.
179. Jensen, A.A., "Metabolism and Toxicokinetics", en: *Biological Effects of Organolead Compounds*, ed. P. Grandjean, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984: 97- 116.
180. Jindal, V. y Gill, K.D. "Ethanol potentiates lead- induced inhibition of rat brain antioxidant defence systems", *Pharmacol. Toxicol.*, 85 (1), Julio, 1999: 16- 21.

181. Joffres, M.R.; Williams, T.; Sabo, B.; y Fox, R.A., "Environmental sensitivities: Prevalence of major symptoms in a referral centre: The Nova Scotia Environmental Sensitivities: research Center Study", *Environ. Health Perspect.*, 109, 2001: 161-171.
182. Johansen, C.; Koch-Henriksen, N.; Rasmussen, S. y Olsen, J.H., "Multiple sclerosis among utility workers", *Neurology*, 52(6), Abril, 1999: 1279-1282.
183. John, B.E. y Boatright, D., "Lead toxicity from gunshot wound", *South Med. J.*, 92 (2), Febrero, 1999: 223-224.
184. John, T.M.; Liu, G.Y. y Brown, G.M., "60 Hz magnetic field exposure and urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in the rat", *Bioelectromagnetics*, 19(3), 1998: 172-180.
185. Joliet- Riant, P. y Tillement, J.P., "Drugs transfer across the blood- brain barrier and improvement of brain delivery", *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13(1), 1999: 16-26.
186. Jonson, M.D. y Anderson, B.D., "In vitro models of the blood- brain barrier to polar permeants: comparison of transmonolayer flux measurements and cell uptake kinetics using cultured cerebral capillary endothelial cells", *J. Pharm. Sci.*, 88(6), Junio, 1999: 620-625.
187. Juutilainen, J. y De Seeze, R., "Biological effects of amplitude-modulated radiofrequency radiation", *Scand. J. Work. Environ. Health*, 24 (4), 1998: 245-254.
188. Karacic, V., et al., "The Relationship between Zinc Protoporphyrin (ZPP) and "free" Erythrocyte Protoporphyrin (FEP) in lead- exposed individuals", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 47, 1980: 165- 177.
189. Kastrup, A.; Engelhorn, T.; Beaulieu, C.; de- Crespigny, A. y Moseley, M.E., "Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood- brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat", *J. Neurol. Sci.*, 166(2), Julio, 1999: 91-99.
190. Keep, R.F.; Ulanski, L.J.; Xiang, J.; Ennis, S.R. y Lorris-Betz, A., "Blood- brain barrier mechanisms involved in brain calcium and potassium homeostasis", *Brain Res.*, 815(2), Enero, 1999: 200-205.
191. Keltner, J.R.; Roos, M.S.; Brakeman, P.R. y Budinger, T.F., "Magnetohydrodynamics of blood flow", *Magn. Reson. Med.*, 16(1), Octubre, 1990: 139-149.

192. Khalil, A.M. y Qassem, W., "Cytogenetic effect of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics", *Mutat. Res.*, 247, 1991: 141-146.
193. Kieseier, B.C.; Paul, R.; Koedel, U.; Seifert, T.; Clements, J.M., Gearing, A.J.; Pfister, H.W. y Hartung, H.P., "Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis", *Brain*, 122 (Pt. 8), Agosto, 1999: 1579-1587.
194. Kim, I.uA; Kim, I.uV.; Kasimbekov, I.K. y Fomenko, B.S., "K⁺, H⁺, and Cl⁻ fluxes across erythrocyte membrane irradiated with radio frequency electromagnetic fields", *Biofis.*, 33(5), Septiembre, 1988: 837-840.
195. Kinouchi, Y.; Tanimoto, S.; Ushita, T.; Sato, K.; Yamaguchi, H. y Miyamoto, H., "Effects of static magnetic fields on diffusion in solutions", *Bioelectromagnetics.*, 9(2), 1988: 159-166.
196. Kirchgessner, M. y Reichlmayer- Lais, A.M., *Trace element metabolism in man and animals*, en: Howell, J.Mc.C.; Gawthorne, J.M.; White, C.L., eds., Camberra: Australian Academy of Science, 1981: 390- 621.
197. Koike- S., "Low level lead exposure and children's intelligence from recent epidemiological studies in the U.S.A. and other countries to progressing reducing lead exposure and screening in the U.S.A.", *Nippon-Eiseigaku- Zassi.*, 52, 1997: 552- 561.
198. Kolodynski, A.A. y Kolodynska, V.V., "Motor and psychological functions of school children living in the area of the Skrunda radio locations station in Latvia", *Sci. Total Environ.*, 180, 1996: 87-91.
199. Kostial, K.; Rabar, I.; Blanusa, M. Y Simonovic, I., "The effect of iron additive to milk on cadmium, mercury and manganese absorption in rats", *Environ. Res.*, 22, 1980: 40-45.
200. Kostial, K. et al., "Combined chelation therapy in reducing tissue lead concentrations in suckling rats", *J. Appl. Toxicol.*, 19 (3), Mayo- Junio, 1999: 143- 147.
201. Kothari, L. y Subramanian, A., "A possible modulatory influence of melatonin on representative phase I and II drug metabolizing enzymes in 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced rat mammary tumorigenesis", *Anticancer Drugs*, 3(6), Diciembre, 1992: 623-628.
202. Kotte, A.N.; van-Leeuwen, G.M. y Lagendijk, J.J., "Modelling the thermal impact of a discrete vessel tree", *Phys. Med. Biol.*, 44(1), Enero, 1999: 57-74.

203. Krocova, Z.; Macela, A.; Kroca, M. y Hernychova, L., "The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro", *Toxicol. Vit.*; 14, 2000: 33-40.
204. Kroll, R.A. y Neuwelt, E.A., "Outwitting the blood- brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means", *Neurosurgery*, 42(5), Mayo, 1998: 1083-1100.
205. Kuksinskii, V.E., "Coagulation properties of the blood and tissues of the cardiovascular system exposed to an electromagnetic field", *Kardiologiya*, 18(3), Marzo, 1978: 107-111.
206. Kuryshv, Y.A.; Brittenham, G.M.; Fujioka, H.; Kannan, P.; Shieh, C.C.; Cohen, S.A. y Brown, A.M., "Decreased sodium and increased transient outward potassium currents in iron-loaded cardiac myocytes. Implications for the arrhythmogenesis of human siderotic heart disease", *Circulation*, 100, ISS 6, 1999: 675-683.
207. Kustova, Y.; Grinberg, A. y Basile, A.S., "Increased blood- brain barrier permeability in LP-BM5 infected mice is mediated by neuroexcitatory mechanisms", *Brain. Res.*, 839(1), Agosto, 1999: 153-163.
208. Lagalla, R.; Lio, D.; Gervasi, F.; De-María, M.; Lo-Casto, A.; Salerno, S. y Cardinale, A.E., "An experimental in-vitro evaluation of membrane antigen expression and of interleukin production by monocytes exposed to magnetic resonance", *Radiol. Med. Torino*, 91(3), Marzo, 1996: 292-296.
209. Lagrange, P.; Romero, I.A.; Minn, A. y Revest, P.A., "Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier", *Free Radic. Biol. Med.*, 27(5-6), Septiembre, 1999: 667-672.
210. Lai, H.; Horita, A. y Guy, A.W., "Acute low-level microwave exposure and central cholinergic activity: studies on irradiation parameters", *Bioelectromagnetics*, 9(4), 1988: 355-362.
211. Lai, H.; Horita, A. y Guy, A.W., "Low-level microwave irradiation and central cholinergic activity: a dose-response study", *Bioelectromagnetics*, 10(2), 1989: 203-208.
212. Lai, H.; Horita, A. y Guy, A.W., "Microwave irradiation affects radial arm maze performance in the rat", *Bioelectromagnetics*, 15, 1994: 95-104.
213. Landry, P.S.; Sadasivan, K.K.; Marino, A.A. y Albright, J.A., "Electromagnetic fields can affect osteogenesis by increasing the rate of differentiation", *Clin. Orthop.*, 338, Mayo, 1997: 262-270.

214. Latt, "Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome", *Proc. National Acad. Sci.*, 70, 1973: 3395.
215. Law, H.T.; Annan, I.; McCarthy, I.D.; Hughes, S.P.; Stead, A.C.; Camburn, M.A. y Montgomery, H., "The effect of induced electric currents on bone after experimental osteotomy in sheep", *J. Bone. Joint. Surg. Br.*, 67(3), Mayo, 1985: 463-469.
216. Leavitt, R.D. et al., *J. Biol. Chem.*, 252, 1977: 2961-2966.
217. Lee, G.U.; Chirisey, L.A. y Colton, R.J., "Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA", *Science*, 266(5186), Noviembre, 1994: 771-773.
218. Leman, E.S.; Sisken, B.F.; Zimmer, S. y Anderson, K.W., "Studies of the interactions between melatonin and 2 Hz, 0.3 mT PEMF on the proliferation and invasion of human breast cancer cells", *Bioelectromagnetics*, 22(3), Abril, 2001: 178-184.
219. Levine, R.L.; Dooley, J.K. y Bluni, T.D., "Magnetic field effects on spatial discrimination and melatonin levels in mice", *Physiol. Behav.*, 58(3), Septiembre, 1995: 535-537.
220. Levshin, I.V., "Permeability of erythrocyte membranes from peripheral blood after exposure to low-frequency alternating electromagnetic field", *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, (1), Enero-Marzo, 1994: 17-19.
221. Liboff, A.R. y McLeod, B.R., "Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields", *Bioelectromagnetics.*, 9(1), 1988: 39-51.
222. Liburdy y Löscher, en: *The Melatonin Hypothesis, Breast Cancer and Use of Electric Power*, Stevens, Wilson y Anderson, eds., Battelle Press, Columbus, 1997: 585.
223. Liddle, C.G.; Putnam, J.P. y Huey, O.P., "Alteration of life span of mice chronically exposed to 2.45 GHz CW microwaves", *Bioelectromagnetics.*, 15(3), 1994: 177-181.
224. Linet, M.S.; Hatch, E.E.; Kleinerman, R.A. et al., "Residential Exposure to Magnetic Fields and Acute Lymphoblastic. Leukaemia in Children", *N. Engl. J. Med.*, 337, 1997: 1-7.
225. Liu, D. S.; Astumian, R.D. y Tsong, T.Y., "Activation of Na⁺ and K⁺ pumping modes of (Na, K)-ATPase by oscillating electric field", *J. Biol. Cem*, 265, 1990: 7260- 7267.

226. Liu, P. y Olivieri, N., "Iron overload cardiomyopathies: new insights into an old disease", *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, 8, 1994: 101- 110.
227. Loginov, V.A.; Timonin, I.M.; Minchenko, B.I. y Klimovitskii, V.I., "The permeability of rat erythrocyte membranes for sodium and potassium ions during exposure to pulsed electromagnetic field under head-down-tilt hypokinesia", *Aviakosm. Ekolog. Med.*, 26(5-6), Septiembre, 1992: 71-75.
228. Löscher, W.; Wahnschaffe, U.; Mevissen, M.; Lerchl, A. y Stamm, A., "Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats", *Oncology*, 51(3), Mayo- Junio, 1994: 288-295.
229. Lorimore, S.A.; Kowalczyk, C.I.; Saunders, R.D. y Wright, E.G., "Lack of acute effects of 20 mT, 50 Hz magnetic fields on murine haemopoiesis", *Int. J. Radiat. Biol.*, 58(4), Octubre, 1990: 713-723.
230. Lucesoli, F.; Caligiuri, M.; Roberti, M.F.; Perazzo, J.C. y Fraga, C.G., "Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload", *Arch. Biochem. Biophys.*, 372, ISS 1, 1999: 37-43.
231. Lukes, A.; Mun- Bryce, S.; Lukes, M. y Rosenberg, G.A., "Extra cellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases", *Mol. Neurobiol.*, 19(3), Junio, 1999: 267-284.
232. Lyle, D.B.; Scheter, P.; Adey, W.R. y Lundak, R.L., "Supresión of T-lymphocyte cytotoxicity following exposure to sinusoidal amplitude modulated fields", *Bioelectromagnetics*, 4, 1983: 281-292.
233. Lloyd, D.C., "Biological dosimetry in radiological protection: recent developments", *J. Soc. Radiol. Protection*, 1984: 4-5.
234. Madden, E.F. y Fowler, B.A., "Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review", *Drug. Chem. Toxicol.*, 23, 2000: 1-12.
235. Maes, P; Collier, M.; Slaets, D. y Verscheve, L., "954 MHz microwaves enhance the mutagenic properties of mytocin C", *Environ. Molec. Mutagen.*, 28, 1996: 26-30.
236. Magos, L., "Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: physicochemical properties, kinetics, and the active species", *Environ. Health Perspect.*, 95, 1991: 157- 189.
237. Mahaffey, K.R. et al., "National estimates of blood lead levels: United States, 1976-1980", *N. Engl. J. Med.*, 307 (10), 1982: 573- 579.

238. Mao, Y.; Yang, G.Y.; Zhou, L.F.; Stern, J.D y Betz, A.L., "Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion", *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, 63(2), Enero, 1999: 366-370.
239. Margonato, V.; Veicsteinas, A.; Conti, R.; Nicolini, P. y Cerretelli, P., "Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats. I. 50 Hz electric fields", *Bioelectromagnetics.*, 14(5), 1993: 479-493.
240. Margonato, V.; Veicsteinas, A.; Conti, R.; Nicolini, P. y Cerretelli, P., "Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: II. 50 Hz magnetic fields", *Bioelectromagnetics.*, 16(6), 1995: 343-355.
241. Markovac, J. y Goldstein, G.W., "Picomolar concentration of lead stimulate brain protein- kinase C", *Nature*, 334, 1998: 71- 73.
242. Mast (van-der), R.C., "Pathophysiology of delirium", *J. Geriatr. Psychiatry. Neurol.*, 11(3), 1988: 138-145.
243. McCann, J.; Dietrich, F.; Rafferty, C. y Marin, A.O., "A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields", *Mutat. Res.*, 297, 1993: 61-95.
244. McKenzie, D.R.; Yin, Y. y Morrell, S. "Childhood incidence of acute lymphoblastic leukaemia and exposure to broadcast radiation in Sydney: a second look", *Aust. N. Z. J. Public Health.*, 22(3 Suppl), 1998: 360-367.
245. McLaren, G.D.; Muir, W.A. y Kellermeyer, R.W., "Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis, and therapy". *CRC. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 19, 1981: 205- 266.
246. McLeod, B.R. y Liboff, A.R., "Dynamic characteristics of membrane ions in multifold configurations of low-frequency electromagnetic radiation", *Bioelectromagnetics.*, 7(2), 1986: 177-189.
247. Medvedev, A.I.; Chernikov, A.V.; Kublik, L.N. y Revina, G.I., "The effect of lead on DNA repair in thymocytes of gamma-irradiated mice", *Radiats. Biol. Radioecol.*, 40, 2000: 81- 85.
248. Mevissen, M.; Stamm, A.; Buntenkotter, S.; Zwingelberg, R.; Wahnschaffe, U. y Löscher, W., "Effects of magnetic fields on mammary tumour development induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rats", *Bioelectromagnetics*, 14(2), 1993: 131-143.

249. Mild et al., Documento del: *National Institute for Working Life* (Sweden), 1998.
250. Misakian, M.; Sheppard, A.R.; Krause, D.; Frazier, M.E. y Miller, D.L., "Biological, physical and electrical parameters for *in vitro* studies with ELF electric and magnetic fields. A primer", *Bioelectromagnetics Suppl.*, 2, 1993: 1-73.
251. Moeschlin, S., "Thallium poisoning", *Clin. Toxicol.*, 17(1), Agosto, 1980: 133-146.
252. Molina- Ballesteros et al., "Urinary ALA as a Biologic Indicator Throughout Penicillamine Therapy in Pb Intoxication", *Arch. Environ. Health.*, 33, 1978: 308.
253. Mosman, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods*, 65, 1983: 55-63.
254. Moulder, J.E.; Erdreich, L.S.; Malyapa, R.S.; Merritt, J.; Pickard, W.F. y Vijayalaxmi, "Cell phones and cancer: what is the evidence for a connection?", *Radiat. Res.*, 151(5), Mayo, 1999: 513-531.
255. Müller, K. O., Stecher, M., en: EMV- ROHDE&SCHWARZ, GmbH & Co., KG, Febrero, 1995.
256. Mun-Bryce, S. y Rosenberg, G.A., "Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases", *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 18(11), Noviembre, 1998: 1163-1172.
257. Muscat, *Wireless Technology Research Symposium*, Jun. 1999.
258. Nakajima, H.; Kishi, T.; Tsuchiya, Y.; Yamada, H. y Tajima, S., "Exposure of fibroblasts derived from keloid patients to low energy electromagnetic fields: preferential inhibition of cell proliferation, collagen synthesis and transforming growth factor beta expression in keloid fibroblasts in vitro", *Ann. Plast. Surg.*, 39(5), Noviembre, 1997: 536-541.
259. Neubauer, C.; Phelan, A.M.; Kues, H. y Lange, D.G., "Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex", *Bioelectromagnetics*, 11(4), 1990: 261-268.
260. Neumann, E., "Digression on chemical electromagnetic field effects in membrane signal transduction. Cooperativity paradigm of the acetylcholine receptor", *Bioelectrochem.*, 52(1), Septiembre, 2000: 43-49.

261. Nordenson, I.; Hansson-Mild, K.; Nordström, S.; Sweins, A. y Birke, E., "Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electric fields: In vivo and in vitro studies", *Radiat. Environ. Biophys.*, 23, 1984: 191-201.
262. Nordström, S., "Reproductive hazards and chromosomal aberrations among workers at high voltage substations", *Proc. Int. Seminar. Biological Effects of Electromagnetic Fields in Relation to Evaluation of Health Hazards from Power Transmission Lines*, Oslo, 1981.
263. Nordström, S.; Birke, E. y Gustavsson, L., "Reproductive hazards among workers at high voltage substations", *Bioelectromagnetics*, 4, 1983: 91-101.
264. Okazaki, M.; Kon, K.; Maeda, N. y Siga, T., "Distribution of erythrocyte in a model vessel exposed to inhomogeneous magnetic fields", *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*, 20(1), 1988: 3-14.
265. Olsen, J.I.I.; Nielsen, A. y Schulgen, O., "Residence near high-voltage facilities and risk of cancer in children", *Brit. Med. J.*, 307, 1993: 891-895.
266. Omote, Y.; Nakajima, S.; Samejima, N.; Kobayashi, S.; Nakajima, S. y Suzuki, T., "Effects of low-frequency pulsing magnetic field upon the respiratory metabolism and transmembrane ion fluxes of perfused rat livers", *Hokkaido. Igaku. Zasshi.*, 63(2), Marzo, 1988: 240-249.
267. Osbakken, M.; Griffith, J. y Taczanowsky, P., "A gross morphologic, histologic, haematologic, and blood chemistry study of adult and neonatal mice chronically exposed to high magnetic fields", *Magn. Reson. Med.*, 3(4), Agosto, 1986: 502-517.
268. Ottani, V.; Monti, M.G.; Piccinini, G.; Pernecco, L.; Zaniol, P.; Ruggeri, A. y Barbiroli, B., "Pulsed electromagnetic fields increase the rate of rat liver regeneration after partial hepatectomy", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 176(4), Septiembre, 1984: 371-377.
269. Paile, W.; Jokela, K.; Koivistoinen, A. y Salomaa, S., "Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields and spark discharges on human lymphocytes in vitro", *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 36, 1995: 15-22.
270. Pan, W. y Kastin, A.J., "Entry of EGF into brain is rapid and saturable", *Peptides*, 20(9), 1999: 1091-1098.
271. Pardridge, W.M., "Blood- brain barrier carrier mediated transport and brain metabolism of amino acids", *Neurochem. Res.*, 23(5), Mayo, 1998: 635-644.

272. Patino, M.M. y Walden, W.E., "Cloning of a functional cDNA for the rabbit ferritin mRNA repressor protein. Demonstration of a tissue-specific pattern of expression", *J. Biol. Chem.*, 267, 1992: 19011.
273. Patra, R.C. y Swarup, D., "Effect of lead on erythrocytic antioxidant defence, lipid peroxide level and thiol groups in calves", *Res. Vet. Sci.*, 68, 2000: 71- 74.
274. Pereira, M.R.; Nutini, L.G.; Fardon, J.C. y Cook, E.S., "Cellular respiration in intermittent magnetic fields", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124(2), Febrero, 1967: 573-576.
275. Pereira, M.C.; Pereira, M.L. y Sousa, J.P., "Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution", *Biomaterials.*, 20, ISS 22, 1999: 2193-2198.
276. Pérez-Calvo, M.; O. García, G. Carbonell, J.V. Tarazona y B. Ribas, "Metalotioneína en trucha como biomarcador de contaminación acuática por cadmio", *Rev. Toxicol.* 16 (3), 1999: 72.
277. Pérez Calvo, M.; García Arribas, O. y Fernández Ipar, A., "Plumbismo: en busca de la alternativa no tóxica", *Bio (COB)*, 16, Madrid, Abril, 1999:19-23.
278. Person, B.R.; Salford, L.G.; Brun, A.; Eberhardt, J.L. y Malmgren, L., "Increased permeability of the blood brain barrier induced by magnetic and electromagnetic fields", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 649, 1992: 356-358.
279. Peter, F. et al., "Fluorometric Determination of Erythrocyte Protoporphyrin in Blood, a Comparison between Direct (Hematofluorometric) and indirect (Extraction) Methods", *Clin. Chem.*, 24 (9), 1978: 1515- 1517.
280. Peters, T.J.; Raja, B.K. y Simpson, R.J., "Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 189, 1989: 141.
281. Piomelli, A.; Seaman, C.; Zullo, D. et al., "Threshold for lead damage to heme synthesis in urban children", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 1982: 3335.
282. Pollan, M.; Gustavsson, P. y Floderus, B., "Breast cancer, occupation, and exposure to electromagnetic fields among Swedish men", *Am. J. Industr. Med.*, 39(3), Marzo, 2001: 276-285.
283. Prasadaraao, N.V.; Wass, C.A.; Stins, M.F.; Shimada, H. y Kim, K.S, "Outer membrane protein A-promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for Escherichia coli invasion", *Infect. Immun.*, 67(11), Noviembre, 1999: 5775-5783.

284. Prato, F.S.; Frappier, J.R.; Shivers, R.R.; Kavaliers, M.; Zabel, P.; Drost, D. y Lee, T.Y., "Magnetic resonance imaging increases the blood-brain barrier permeability to 153-gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid in rats", *Brain Res.*, 523, 1990: 301-304.
285. Prato, F.S.; Wills, J.M.; Roger, J.; Frappier, H.; Drost, D.J.; Lee, T.Y.; Shivers, R.R. y Zabel, P., "Blood-brain barrier permeability in rats is altered by exposure to magnetic fields associated with magnetic resonance imaging at 1,5 T", *Microsc. Res. Tech.*, 27 (6), 1994: 528-534.
286. Proudfoot, A., *Diagnosis and management of acute poisoning*, Blackwell, Oxford, 1982.
287. Pu, J.S; Chen, J.; Yang, Y.H. y Bai, Y.Q., "The effects of 3000 MHz microwave irradiation on electroencephalic energy and energy metabolism in mouse brain". *Electro- Magnetobiology*, 16, 1997: 243-247.
288. Rabinovitch, B.; Maling, J.E. y Weissbluth, M., "Enzyme-substrate reactions in very high magnetic fields", *Biophys. J.*, 7(2), Marzo, 1967: 187-204.
289. Ragan, H.A.; Buschbom, R.L.; Pipes, M.J.; Phillips, R.D. y Kaune, W.T., "Hematologic and serum chemistry studies in rats exposed to 60-Hz electric fields", *Bioelectromagnetics.*, 4(1), 1983: 79-90.
290. Rank, B.H. et al., "Abnormal redox status of membrane- protein thiols in sickle erythrocytes", *J. Clin. Invest.*, 65, 1985: 1531- 1537.
291. Recuero, M., *Ingeniería acústica*, Paraninfo, Madrid, 1989.
292. Reinholz, M.M.; Haggard, J.J.; Curran G.L. y Poduslo, J.F., "Plasma pharmacokinetics, nervous system biodistribution and biostability, and spinal cord permeability at the blood-brain barrier of putrescine- modified catalase in the adult rat", *Exp. Neurol.*, 159(1), Septiembre, 1999: 191-203.
293. Reitz, John R., *Fundamentos de la teoría electromagnética*. 4ª ed., Argentina: Addison- Wesley Iberoamericana, S.A., 1996.
294. Repacholi, M.H., "Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs", *Bioelectromagnetics*, 19(1), 1998: 1-19.

295. Ribas, B.; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M. y García Ferriz, P., "Some data on the comparison between eucariotic cell electric activity and the electromagnetic hypersensitivity syndrome", *XIII Miedzynarodowa Konferencja Naurokowo-Techniczna*, ELSAF, 1, 2001:148-155.
296. Ribas, B.; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M.; Sebastián, J. L.; Muñoz, S. y Garrido, J.A., "Determinación de la permitividad y conductividad eléctricas a la frecuencia de microondas de varios tejidos de ratas tratadas con cadmio", *An. Real Acad. Farmacia*, 67(1), 2001: 15-25.
297. Ribas, B.; García Arribas, O.; Pérez Calvo, M. y Vázquez, M., "Interrelationships between extremely low frequency magnetic fields (50Hz) and chemical exposure on the blood brain barrier permeability", *XIII Miedzynarodowa Konferencja Naurokowo-Techniczna*, ELSAF, 1, 2001:141-146.
298. Rodier, P.M., "Developing brain as a target of toxicity", *Environ. Health. Perspect.*, 103, supl.6, Septiembre, 1995: 73-76.
299. Rogers et al., en: *The Melatonin Hypothesis*, Stevens, Wilson y Anderson, eds., Battelle Press, Columbus, Richland, 1997: 429.
300. Rogers, N.; van-den-Heuvel, C. y Dawson, D., "Effect of melatonin and corticosteroid on in vitro cellular immune function in humans", *J. Pineal. Res.*, 22(2), Marzo, 1997: 75-80.
301. Rosenberg, G.A; Estrada, E.Y. y Dencoff, J.E., "Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain", *Stroke*, 29(10), Octubre, 1998: 2189-2195.
302. Rosenblatt, C.; Yager, P. y Schoen, P.E., "Orientation of lipid tubules by a magnetic field", *Biophys. J.*, 52(2), Agosto, 1987, 295-301.
303. Rothman, K.J.; Chou, C.K.; Morgan, R.; Balzano, Q.; Guy, A.W.; Funch, D.P.; Preston-Martin, S.; Mandel, J.; Steffens, R. y Carlo, G., "Assessment of cellular telephone and other radio frequency exposure for epidemiological research", *Epidemiology*, 7(3), Mayo, 1996: 291-298.
304. Rubin, L.L. y Staddon, J.M., "The cell biology of the blood-brain barrier", *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, 1999: 11-28.
305. Saffer, J.D. y Thurston, S.J., "Cancer risk and electromagnetic fields", *Nature*, 375, 1995: 22-23.

306. Salerno, S.; Lo-Casto, A.; Caccamo, N.; d'Anna, C.; De-María, M.; Lagalla, R.; Scola, L. y Cardinale, A.E., "Static magnetic fields generated by a 0.5 T MRI unit affects in vitro expression of activation markers and interleukin release in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)", *Int. J. Radiat. Biol.*, 75(4), Abril, 1999: 457-463.
307. Salford, L.G.; Persson, B.R.; Brun, A.; Ceberg, C.P.; Kongstad, P.C. y Mir, L.M., "A new brain tumour therapy combining bleomycin with in vivo electroporation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194(2), Julio, 1993: 938-943.
308. Salford, L.G.; Brun, A.; Stureson, K.; Eberhardt, J.L. y Persson, B.R., "Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz", *Microsc. Res. Tech.*, 27(6), Abril, 1994: 535-542.
309. Sancho, M. y López, E., "Campos electromagnéticos y salud", *Rev. Esp. Fisiol.*, 9, 1995: 21.
310. Santos, J.L. et al., "Nonsynergic effect of ethanol and lead on heme metabolism in rats", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43 (1), Mayo, 1999: 98-102.
311. Saran, M. y Bors, W., "Radical reactions in vivo: an overview", *Radiat. Environ. Biophys.*, 29, 1990: 249- 262.
312. Sarkar, S.; Ali, S. y Behar, J., "Effect of low power microwave on the mouse genome: A direct DNA analysis", *Mutat. Res.*, 320, 1994: 141-147.
313. Sato, S.; Kawase, T.; Harada, S.; Takayama, H. y Suga, S., "Effect of hyperosmotic solutions on human brain tumour vasculature", *Acta Neurochir. Wien.*, 140(11), 1998: 1135-1142.
314. Saunders, N.R.; Habgood, M.D. y Dziegielewska, K.M., "Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26(1), Enero, 1999: 11-19.
315. Saunders, N.R.; Habgood, M.D. y Dziegielewska, K.M., "Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26(2), Febrero, 1999: 85-91.
316. Savitz, D.A.; Wachtel, H.; Barnes, F.A.; John, E.M. y Tvrdek, J.G., "Case control study of childhood cancer and exposure to 60 Hz magnetic fields", *Am. J. Epidemiol.*, 128, 1988: 21-38.

317. Scarfi, M.R.; Versan, F.; Cossarizza, A.; Monti, D.; Castellani, G.; Cadossi, R.; Franceschetti, G. Y Franceschi, C., "Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed magnetic fields", *Biochem. Biophys. Res. Común.*, 176(1), Abril, 1991: 194-200.
318. Scarfi, M.R.; Bernasi, F.; Cossarizza, A.; Monti, D.; Zeni, O.; Lioi, M.B.; Franceschetti, G.; Capri, M. y Franceschi, C., "50 Hz AC sinusoidal electric fields do not exert genotoxic effects (micronucleus formation) in human lymphocytes", *Radiat. Res.*, 135(1), Julio, 1993: 64-68.
319. Scarfi, M.R.; Prisco, F.; Bersani, F.; Lioi, M.B.; Zeni, O.; Di Pietro, R.; Franceschi, C.; Motta, M.; Iafusco, D. y Stoppoloni, G., "Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in lymphocytes from subjects affected by Turner's syndrome", *Mutat. Res.*, 357(1-2), Octubre, 1996: 183-190.
320. Schellhammer, P.F. et al., "Histochemical studies of the myocardium and conduction system in acquired iron- storage disease", *Circulation*, 35, 1967: 631- 637.
321. Schubert, D. y Chevion, M., "The role of iron in beta amyloid toxicity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 216 (2), Noviembre, 1995: 702- 707.
322. Schuz, J.; Grigat, J.P.; Brinkmann, K. y Michaelis, J., "Childhood acute leukaemia and residential 16.7 Hz magnetic fields in Germany", *British J. of Cancer*, 84(5), Marzo, 2001: 697-699.
323. Schwan, H.P., "Biological effects of non- ionising radiation: Cellular Properties and Interactions", *Ann. Biomed. Eng.*, 16, 1988: 245-263.
324. Schwartz, K.; Milne, D.B.; Vineyard, E., *Biochem Biophys Res Commun.*, 40, 1970: 22.
325. Sebastián, J.L. et al., 20th BEMS Meeting, Junio, 1998: 172-173.
326. Sebastián, J.L.; Muñoz, S.; Sancho, M. y Miranda, J.M., "Analysis of the influence of the cell geometry, orientation and cell proximity effects on the electric field distribution from direct RF exposure", *Phys. Med. Biol.*, 46(1), 2001: 213-225.
327. Sedlakova, R.; Shivers, R.R. y Del Maestro, R.F., "Ultrastructure of the blood- brain barrier in the rabbit", *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 31(1), Enero, 1999: 149-161.
328. Selmaoui, B. y Touitou, Y., "Sinusoidal 50-Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin. Role of duration and intensity of exposure", *Life Sci.*, 57(14), 1995: 1351-1358.

329. Sercombe, R., "Vascular wall modifications after disruption of the circulation leading to cerebral ischemia", *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, 18(5), Mayo, 1999: 583-587.
330. Shacter, E. et al., "DNA damage induced by phorbol ester – stimulated neutrophils is augmented by extracellular cofactors. Role of histidine and metals", *J. Biol. Chem.*, 265, 1990: 6693- 6699.
331. Shlygin, V.V., "Possible changes in blood vessels during exposure to electromagnetic field", *Biofizika.*, 39(5), Septiembre-Octubre, 1994: 903-910.
332. Simko, M.; Dopp, E. y Kriehuber, R., "Absence of synergistic effects on micronucleus formation after exposure to electromagnetic fields and asbestos fibres in vitro", *Toxicol. Lett.*, 108(1), Julio, 1999: 47-53.
333. Singh, J. et al., "State of pregnancy modifies lead toxicity in mice", *Biol. Trace Elem. Res.*, 67 (3), Marzo, 1999: 205- 13.
334. Skoog, I., "A review on blood pressure and ischaemic white matter lesions", *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 9 Suppl. 1, Julio, 1998: 13-19.
335. Skyberg, K.; Hansteen, I.L. y Vistnes, A.I., "Chromosomal aberrations in lymphocytes of employees in transformer and generator production exposed to electromagnetic fields and mineral oil", *Bioelectromagnetics*, 22(3), Abril, 2001: d150-160.
336. Snow, E.T., "Metal carcinogenesis: mechanistic considerations", *Pharmacol. Ther.*, 53, 1992: 31- 65.
337. Snyder, J.E.; Filipov, N.M.; Parsons, P.J. y Lawrence, D.A., "The efficiency of maternal transfer of lead and its influence on plasma IgE and splenic cellularity of mice", *Toxicol. Sci*, 57, 2000: 87-94.
338. Snyder, R.D. y Lachmann, P.J., "Thiol involvement in the inhibition of DNA repair by metals in mammalian cells", *Mol. Toxicol.*, 2, 1989: 117- 128.
339. Sollazo, V.; Traina, G.C.; DeMattei, M.; Pellati, A.; Pezzetti, F y Caruso, A., "Responses of human MG-63 osteosarcome cell line and human osteoblast- like cells to pulsed electromagnetic fields", *Bioelectromagnetics*, 18(8), 1997: 541-547.
340. Staudenmayer, H., *Environmental Illness*, Lewis Publishers, Washington D.C, 1999.
341. Stevens, R.G.; Davis, S.; Thomas, D.B.; Anderson, L.E. y Wilson, B.W. "Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer", *FASEB. J.*, 6(3), Febrero, 1992: 853-860.

342. Stuchly, M.A. y Stuchly, S.S., "Dielectric properties of biological substances- tabulated", *J. of Microwave Power*, 15(1), 1980: 19-26.
343. Suga, R. S. et al., "Establishment of normal values in adults for zinc protoporphyrin (ZPP) using hematofluorometer: correlation with normal blood lead values", *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 42 (9), 1981: 637- 642.
344. Sun, X. et al., "Analysis of differential effects of Pb^{2+} on protein kinase C isozymes", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(1), Abril, 1999: 40- 45.
345. Suzuki, H.; Nagashima, T.; Tamaki, N. y Yamadori, T., "Cerebral ischemia affects glucose transporter kinetics across the rat brain microvascular endothelium: quantitative analysis by an in situ brain perfusion method", *Surg. Neurol.*, 49(1), Enero, 1998: 67-76.
346. Swanson, J. y Jeffers, D., "Possible mechanisms by which electric fields from power lines might affect airborne particles harmful to health", *J. Radiol. Prot.*, 19(3), Septiembre, 1999: 213-229.
347. Szmigielski, S.; Szudzinski, A.; Pietraszek, A.; Bielec, M.; Janiak, M. y Wrembel, J.K., "Accelerated development of spontaneous and benzopyrene-induced skin cancer in mice exposed to 2450-MHz microwave radiation", *Bioelectromagnetics*, 3(2), 1982: 179-191.
348. Szmigielski, S., "Cancer mortality in subjects occupationally exposed to high frequency (Radiofrequency and microwaves) electromagnetic radiation", *Sci. Total Environ.*, 180, 1996: 9-17.
349. Szmigielski, S., en: Marino (ed.): *Modern Bioelectricit'*. New York: Marcel Dekker, 1998: 861- 925.
350. Tenforde, T.S. y Liburdy, R. P., "Magnetic deformation of phospholipidic bilayers: effects on liposoma shape and solute permeability at prophase transition temperatures", *J. Theor. Biol.*, 133, 1988: 385- 396.
351. Tenforde, T.S., en: *Biological Effects of Electromagnetic Fields*. Polk y Postow, eds., CRC Press, Boca Ratón, 1996: 185.
352. Thumm, S.; Loschinger, M.; Glock, S.; Hammerle, H. y Rodemann, H.P., "Induction of cAMP-dependent protein kinase A activity in human skin fibroblasts and rat osteoblasts by extremely low-frequency electromagnetic fields", *Radiat. Environ. Biophys.*, 38(3), Septiembre, 1999: 195-199.
353. Toler, J.C.; Shelton, W.W.; Frei, M.R.; Merritt, J.H. y Stedham, M.A., "Long-term, low-level exposure of mice prone to mammary tumours to 435 MHz radiofrequency radiation", *Radiat. Res.*, 148(3), Septiembre, 1997: 227-234.

354. Tomenius, L., "50 Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumours in Stockholm county", *Bioelectromagnetics*, 7, 1986:191-207.
355. Toroptsev, I.V. y Soldatova, L.P., "Pathomorphological reactions of the cerebral cortex nerve elements during treatment with an alternating magnetic field", *Arkh. Patol.*, 43 (11), 1981: 33-36.
356. Traikov, L.L.; Markov, M.S.; Kuzmanova, M.A. e Ivanov, S.P., "Use of lectins as indicators for magnetic field action on erythrocyte membranes", *Rev. Environ. Health.*, 10(3-4), Julio-Diciembre, 1994: 243-246.
357. Tsao, D.A.; Yu, H.S.; Cheng, J.T.; Ho, C.K. y Chang, H.R., "The change of beta-adrenergic system in lead-induced hypertension", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 164, 2000: 127- 133.
358. Turecky, L.; Kalina, P.; Uhlikova, E. y Prochazkova, L., "Cerebrospinal fluid proteins in the diagnosis of disorders of the blood- cerebrospinal fluid barrier in central nervous system diseases", *Brat. Lek. Listy*, 99(7), Julio, 1998: 347-350.
359. Tynes, T.; Andersen, A.; Langmark, F., "Incidence of cancer in Norwegian workers potentially exposed to electromagnetic fields", *Am. J. Epidemiol.*, 136, 1992: 81-88.
360. Tynes, T.; Hannevik, M.; Andersen, A.; Vistnes, A.I. y Haldorsen, T., "Incidence of breast cancer in Norwegian female radio and telegraph operators", *Cancer Causes Control*, 7(2), Marzo, 1996: 197-204.
361. Tyson, *Methods in Toxicology*, Academic Press, Julio, 1994.
362. Úbeda, A. y Trillo, M.A., "Radiaciones RF de antenas de telefonía y Salud Pública", *Radioprotección*, VII (29), 1999: 24-36.
363. Unsgaard, G.; Hammerstrom, J. y Lamvik, J., "Dissociation between tumour cell cytostatic and immuno-suppressive capacity of human monocytes activated with lymphokines", *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.*, 90(2), Abril, 1982: 73-79.
364. Valberg, P.A. y Butler, J.P., "Magnetic particle motions within living cells. Physical theory and techniques", *Biophys. J.*, 52(4), Octubre, 1987: 537-550.

365. Valberg, P.A. y Feldman, H.A., "Magnetic particle motions within living cells. Measurement of cytoplasmic viscosity and motile activity", *Biophys. J.*, 52(4), Octubre, 1987: 551-561.
366. Valberg, P.A., "Designing EMF experiments: what is required to characterize "exposure"?", *Bioelectromagnetics*, 16(6), 1995: 396-406.
367. Valberg, P.A.; Kavet, R. y Rafferty, C.N., "Can Low-Level 50/60 Hz Electric and Magnetic Fields Cause Biological Effects?", *Radiat. Res.*, 148, 1997: 2-21.
368. Valberg, P.A., "How do endogenous forces in cells compare to forces and torques caused in cells by external electric and magnetic fields?", en AAVV, *Radiat. Res.*, vol.2: Proceedings, Dublín, Irlanda, 18-23 de Julio, 1999: 219-221.
369. Valjus, J.; Norppa, H.; Jarventaus, H.; Sorsa, M.; Inquirí, E.; Salomaa, S.; Jarvinen, P. y Kajander, J., "Analysis of chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei among power linesmen with long-term exposure to 50-Hz electromagnetic fields", *Radiat. Environ. Biophys.*, 32(4), 1993: 325-336.
370. Vega, J. et al., "Chronic exposure to environmental lead in Chilean infants. II: Effects on the psicomotor development", *Rev. Med. Chil.*, 127 (1), Enero, 1999: 28- 37.
371. Verkasaalo, P.K.; Pukkal, E.; Hongisto, M.Y.; Valjus, J.E.; Jarvinen, P.J.; Heikkila, K.V. y Koskenvuo, M., "Risk of cancer in Finnish children living close to power lines", *Brit. Med. J.*, 307, 1993: 895-899.
372. Vorobyov, V.V.; Galchenko, A.A.; Kukushkin, N.L. y Akoev, I.G., "Effects of weak microwave fields amplitude modulated at ELF on EEG of symmetric brain areas in rats", *Bioelectromagnetics*, 18, 1997: 293-298.
373. Wadi, S.A. y Ahmad, G., "Effects of lead on the male reproductive system in mice", *J. Toxicol. Environ. Health*, 56 (7), Abril, 1999: 513- 521.
374. Watson, J.M.; Parrish, E.A. y Rinehart, C.A., "Selective potentiation of gynaecologic cancer cell growth in vitro by electromagnetic fields", *Gynecol. Oncol.*, 71(1), Octubre, 1998: 64-71.
375. Weeden, R.P., *Poison in the Pot: the legacy of lead*. Carbondale, Ill: Southern Illinois, ed. University Press, 1984.
376. Weeden, R.P., "Occupational renal diseases", *Am. J. Kidney Dis.*, 3, 1984: 241.

377. Weeden, R.P , "Blood lead levels, dietary calcium and hypertension",
Ann. Intern. Med., 102, 1985: 403.
378. Wertheimer, N. y Leeper, E., "Electrical wiring configurations in childhood cancer", *Am. J. Epidemiol.*, 109, 1979: 272-284.
379. Witz, G., "Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis",
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 198, 1991: 675- 682.
380. Wolpaw, J.R.; Seegal, R.F. y Dowman, R., "Chronic exposure of primates to 60 Hz electric and magnetic fields: I. Exposure system and measurements of general health and performance",
Bioelectromagnetics., 10(3), 1989: 277-288.
381. Wu, R.Y.; Chiang, H.; Shao, B.J.; Li, N.G. y Fu, Y.D., "Effects of 2.45-GHz microwave radiation and phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice",
Bioelectromagnetics; 15(6), 1994: 531-538.
382. Yang, G.Y.; Gong, C.; Qin, Z.; Liu, X.H. y Lorris- Betz, A., "Tumour necrosis factor alpha expression produces increased blood- brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia", *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 69(1), Mayo, 1999: 135-143.
383. Yellon, S.M., "Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster", *J. Pineal Res.*, 16(3), Abril, 1994: 136-144.
384. Yong, V.W.; Krekoski, C.A.; Forsyth, P.A.; Bell, R. y Edwards, D.R., "Matrix, metalloproteinases and diseases of the CNS", *Trends Neurosci.*, 21(2), Febrero, 1998: 75-80.
385. Yuan, D.; Zhou, W. y Ye, S., "Effect of leaded and unleaded gasoline on the mutagenicity of vehicle exhaust particulate matter", *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19, 2000: 41-48.
386. Zaidi, A. y Michaelis, M.L., "Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase", *Free-Radic. Biol. Med.*, 27(7-8), Octubre, 1999: 810-821.
387. Zarankova, V. y Chifchiiski, S., "Enzyme histochemical studies of gum papillae in parodontopathia dystrophica after treatment with magnetotherapy", *Folia. Med. Plovdiv.*, 28(4), 1986: 35-44.
388. Zhang, L.; Looney, D.; Taub, D.; Chang, S.L.; Way, D.; Witte, M.H.; Graves, M.C. y Fiala, M., "Cocaine opens the blood brain barrier to HIV-1 invasion", *J. Neurovirol.*, 4(6), 1998: 619-626.

389. Zimmermann, U.; Vienken, J.; Pilwat, G. y Arnold, W.M., "Electro-fusion of cells: principles and potential for the future", *Ciba. Found. Symp.*, 103, 1984: 60-85.

DOCUMENTOS

390. D.O.C.E., N° C 205/440, Documento N° A3-0238/94 del Jueves 5 de Mayo de 1994.
391. EC, "Public health and safety at work, non- ionising radiation sources, exposure and health effects", en: Mckinlay,. Directorate General V, Employment, Public Relations and Social Affairs, Luxembourg, European Commission, 1996a.
392. EC, "Possible health effects related to the use of radiotelephones. Proposal for research programme by European Commission Expert Group", Directorate General XIII, Telecommunications Information Market and Exploitation of Research, Brussels, European Commission, 1996b.
393. IARC, "Arsenic and inorganic arsenic compounds", *Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.*, 2, 1973.
394. IARC, "Some metals and metallic compounds", *Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.*, 23, 1980.
395. IARC, "Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1- 42, supplement 7", *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, 1987.
396. IARC. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, World Health Organization, Suppl. 7, 56, 1987.
397. IARC, "Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry", *Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.*, 1993.
398. ICNIRP, "Health issues related to the use of hand held radiotelephones and base transmitter", *Health Phys*, 70, 1996: 587- 593.
399. ICNIRP Publication 4/97, 1997: 185-190.

400. ICNIRP, "Guidelines for limiting Exposure to Time- varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields (Up to 300 GHz)", *Health Physics*, 74, 1998: 494-520.
401. NRPB, "Electromagnetic fields and the risk of cancer. Report of an advisory group on non-ionising radiation", *Documents of the NRPB* 3, (1), 1992: 138.
402. UNEP/WHO/IRPA, "Electromagnetic fields 300 Hz- 300 GHz", *Environmental Health Criteria*, 137, Ginebra, 1993.
403. WHO, "Non ionising Radiation Protection", World Health Organization Regional Publications, Regional Office for Europe, Copenhagen, European Series, 30, 1991.
404. WHO, Documentos descriptivos. Nr. 193, 1998; Nr. 205, 1998.
405. WHO, Ordinance on Non- Ionizing Radiation Protection, 1 de Febrero de 2000.

ANEXO I

Advertencia previa

Como ya adelantamos en la introducción de la presente tesis doctoral, a tenor de la inquietud que la materia de nuestro trabajo suscita, hoy en día, en la opinión pública, consideramos oportuno desarrollar dicho aspecto del problema, a pesar de no ser éste el objeto de nuestro estudio ni de tener clara relevancia para los propósitos científicos de la tesis; nuestra decisión al respecto se funda en el hecho de que dicha inquietud no deja de constituir, en cierta medida, uno de los principales propulsores de todos los estudios que vienen llevándose a cabo en los últimos tiempos acerca de los posibles efectos sobre la salud de las radiaciones electromagnéticas, así como a la circunstancia de que la polémica abierta respecto a este tema se hace cada vez más patente. A fin de no comprometer el rigor de nuestra tesis comentaremos, pues, este punto, en el presente apéndice.

Percepción social

El interés social que la que se ha dado en denominar “contaminación blanca” o “electrosmog”¹ suscita, se pone de manifiesto en los numerosos artículos divulgativos y de opinión que, de un tiempo a esta parte, y cada vez con más frecuencia, vienen apareciendo en los distintos medios de comunicación,²

¹ El término “electrosmog” fue acuñado en Alemania para describir la contaminación por radiaciones de campos electromagnéticos.

² Un ejemplo reciente lo constituyen los artículos aparecidos en la prensa en el año 2001, “El uso de móviles no se asocia con mayor riesgo de cáncer”, *El País*, Barcelona, 20/2/2001, p.7; Adolfinia García, “El 95% de las antenas de telefonía está demasiado cerca de los hogares”, *Madrid*, 20/2/2001; Alberto de las Fuentes, “Contaminación blanca pero peligrosa”, *El Mundo*, Año II, 53, *Ariadn@*, 5/7/2001, p. 10; Alberto de las Fuentes, “Diez cuestiones sobre las antenas”, *El Mundo*, Año II, 60, *Ariadn@*, 27/9/2001, p. 7.

hasta el punto de poder hablar de una verdadera alarma social en relación a este asunto.

Este tipo de contaminación, que invade día y noche nuestro hábitat, constituye una materia en la que existe una creciente concienciación ciudadana, materializada en las numerosas quejas y denuncias planteadas ante distintos organismos oficiales e instituciones públicas, al apreciarse que la acumulación ilimitada de energía radiante en los hogares no puede ser positiva, cabiendo la posibilidad, incluso, de llegar a niveles de daño fisiológico evidente.

La percepción social de una materia determinada marca los comportamientos y reacciones (favorables o adversos) del público en general frente a la misma, que tienen su repercusión en todos los ámbitos de la vida cotidiana. Las informaciones parciales o erróneas, debido a la rapidez actual del flujo informativo y a su gran alcance, amenazan con llevar a la sociedad a un estado de inquietud rayano en la histeria, sobre todo cuando sospecha que es su salud lo que está en juego: a la percepción del riesgo se añade la indignación y la impotencia por la desinformación y el aparente desamparo de los supuestos afectados por el problema.

No es de extrañar, pues, que desde finales de los años ochenta, la acción vecinal haya protagonizado movilizaciones, denuncias y todo tipo de oposición a instalaciones generadoras de CEM. A modo de ejemplo se pueden citar diversas movilizaciones que a lo largo de los años han tenido lugar en la Comunidad

Autónoma de Madrid, desde la que tuvo lugar en el año 1989 en el municipio de San Sebastián de los Reyes, de resultas de la oposición a una línea de alta tensión que atravesaba el sector, hasta la más reciente de los vecinos del barrio de Orcasitas, en Septiembre de este mismo año, exigiendo el soterramiento total de los cables de alta tensión del distrito,³ o las protestas que, desde hace meses, viene planteando una asociación de padres de Valladolid, cuyos hijos asisten a un colegio colindante con un edificio en el que se ubica un gran número de antenas de telefonía.⁴ Toda esta actividad conlleva repercusiones en las políticas y decisiones municipales.

Jurisprudencia

Un claro reflejo de la postura de una sociedad ante un determinado problema es la jurisprudencia que, en un periodo de tiempo dado, se genera al respecto. Así, el incremento señalado de quejas y denuncias, tanto por parte de particulares como de asociaciones de vecinos acerca de este asunto, ha llevado consigo la aparición de los primeros procedimientos en la materia por daños derivados de instalaciones generadoras de este tipo de contaminación. Así, estos primeros procedimientos sobre la materia que nos ocupa, han sido resueltos por medio de la Sentencia del Juzgado de Primera Instancia número 6 de Murcia, de 14 de Abril de 2000, confirmada en la Audiencia Provincial, relativa a campos

³ “Mil vecinos de Orcasitas, contra los cables de alta tensión”, *ABC Madrid*, 23/9/2001, p.8, col. 1.

⁴ Cristina López Schlichting, “El móvil del cáncer”, *El Mundo*, año XIII, nº 324, Crónica, 30/12/2001, p.p. 1-3; G. Rivas, “Los padres acampan ante el colegio cerrado en Valladolid”, *El Mundo*, 4/01/2002, p. 27; Arturo Soria y Puig, “Un «edificio repetidor» bajo sospecha”, *El Mundo*, 4/01/2002, p. 27; G. Rivas, “ Los padres del colegio de Valladolid no enviarán a sus hijos a otro centro”, *El Mundo*, 5/01/2002

electromagnéticos generados por transformadores; la Sentencia del Juzgado de Primera Instancia número 2 de Bilbao, de 9 de Junio de 2001, sobre radiaciones electromagnéticas producidas por una antena de telefonía móvil, y la más reciente del Juzgado de Instrucción número 2 de Valladolid, de fecha 21 de Diciembre de 2001, referente a seis antenas de telefonía fija.

En la primera sentencia citada, la misma condena a la empresa titular del transformador -de baja tensión- que existe en los bajos de la vivienda de los demandantes, a adoptar las medidas necesarias para que los campos electromagnéticos no invadan la vivienda de los actores y, en todo caso, no superen las 0,3 nanoteslas. En caso de no ser posible, condena a la demandada a indemnizar a la actora con el importe del valor de una vivienda de las mismas características que la de los actores. Todo ello sin perjuicio de la indemnización por los daños causados.

En esta primera sentencia se considera probada la inmisión, y aplica la doctrina sentada por el Tribunal Supremo sobre inmisiones en general y los artículos 590, 1908.2 y 1902 del Código Civil –base de las reclamaciones ambientales en vía civil-, pues de la pericial practicada resulta acreditado que en la vivienda de los demandantes, con todas las luces y electrodomésticos apagados, el campo electromagnético es permanentemente superior a una nanotesla, llegando incluso a alcanzar las cuatro nanoteslas.

Según la propia sentencia, existen estudios recientes que apuntan a la existencia de efectos biológicos en medidas inferiores a una nanotesla, pero de los que se ignora la trascendencia que puedan tener para los humanos. La aplicación de los artículos anteriormente citados implica la teoría del riesgo y sus consecuencias, es decir, la presunción de culpa y la inversión de carga de la prueba.

Evidentemente, el problema se planteó en cuanto a la prueba del daño provocado por la inmisión. Habiendo declarado el perito, como no podía ser hoy de otro modo, su desconocimiento sobre si los efectos de unas inmisiones como las descritas son o no peligrosos para el ser humano, aunque pudieran serlo, la sentencia recoge como daño el elemental desasosiego –daño moral- en los habitantes de las viviendas donde se introduzcan este tipo de inmisiones. Así, la sentencia establece que, “si bien es cierto que no existe prueba actual de daño físico alguno, no lo es menos que se puede derivar la existencia de un daño moral que viene constituido y fundamentado en el elemental y normal desasosiego e intranquilidad que surgen en unas personas por la posibilidad de que donde se desarrollan los elementos más esenciales de su vida, esto es, en su vivienda, se están produciendo una serie de emisiones que pudieran ser nocivas para la salud tanto de ellos como de sus hijos”.

En la sentencia del Juzgado de Primera Instancia nº2 de Bilbao, de 9 de Junio de 2001 se declara la nulidad del acuerdo comunitario que ampara la instalación de la antena emisora de telefonía móvil en la azotea del edificio de la

comunidad de propietarios, condenando a la citada comunidad y a la empresa de telefonía móvil a estar y pasar por dicha declaración.

En esta segunda sentencia una menor, habitante de la vivienda, estaba diagnosticada, en el momento de adoptarse el acuerdo impugnado, de síndrome de trastorno por déficit de atención con hiperactividad, de modo que si bien no ha quedado acreditado que el funcionamiento de la antena produzca daños en la salud, sí existe una duda razonable de que pueda afectar a la dolencia padecida por la niña.

La sentencia del Juzgado de Primera Instancia de Bilbao aprovecha el contenido de la Sentencia de la Audiencia Provincial de Murcia, de 13 de Febrero de 2001, resolutoria del recurso de apelación de la sentencia del Juzgado de Primera Instancia de Murcia –“pionera del control de legalidad de una negatoria de servidumbre por injerencia de un campo electromagnético”, en palabras de la propia sentencia del Juzgado de Primera Instancia de Bilbao-, y en ese sentido se destaca que “el tercero es quien tiene que acreditar la legitimidad de su ejercicio de intromisión y/o la inocuidad de la misma, ya que en caso contrario se estaría presumiendo *iuris tantum* la legitimidad de una negación o intromisión posesoria”.

De acuerdo con la sentencia señalada, existe una tesis aprovechable común entre la sentencia de la Audiencia Provincial de Murcia y la del Juzgado de Primera Instancia de Bilbao, “un campo de radiaciones no ionizantes en una

vivienda en propiedad horizontal, por encima de los valores normales de cualquiera otra por emanaciones de los aparatos electrodomésticos, es una servidumbre comunitaria cuando deriva de una fuente que opera por cesión de elementos comunes, y para que se imponga al propietario disidente del acuerdo autorizado, debiera ésta obedecer a la creación de un servicio común de interés general del inmueble que la haga imprescindible, con su correspondiente indemnización, o bien debiera probarse cumplidamente que es inocuo en absoluto, ya que la distancia a la interposición de parámetros hace desaparecer el campo, y pudiera haberse escogido para la fuente de radiaciones un punto alejado de viviendas, o protegido del alcance directo”. Recordar que si bien la sentencia del Juzgado de Primera Instancia de Murcia es pionera en España como sentencia de condena por contaminación electromagnética, ya se han producido otras en el mismo sentido en Italia, Suiza y Alemania.

En cuanto a la sentencia más reciente, la del Juzgado de Instrucción de Valladolid,⁵ se ordena el desmantelamiento de seis instalaciones de telefonía fija ubicadas en un edificio de una de las calles más céntricas de la ciudad, al entender que pueden entrañar riesgo para la salud de las personas, además de infringir claramente la legalidad urbanística.

Las antenas de telefonía fija son utilizadas para el envío de una gran cantidad de datos, emitiendo a una frecuencia de entre 3,5 y 26 GHz, distinta a la

⁵ De la que se hace eco el artículo de Fernando Martín, “Un juez ordena retirar seis antenas de telefonía fija”, *El Mundo*, 22/12/2001, p.37.

empleada por la telefonía móvil. En el caso concreto de Valladolid, la presencia de entidades bancarias en la zona explica que sobre el tejado haya hasta 49 sectores de siete empresas distintas.

La decisión del juez se produce tres meses después del inicio de las movilizaciones y protestas de los padres de alumnos de un centro escolar situado en las inmediaciones del edificio donde se hallan instaladas las antenas. Los padres sostienen que existe una relación directa entre las antenas y la aparición de tres casos de cáncer en los alumnos del centro. Si bien el juez entiende, por el contrario, que no hay indicio alguno que demuestre la existencia de una relación de causa-efecto entre las antenas y los tres niños enfermos, sí recuerda, sin embargo, que los efectos de las emisiones electromagnéticas en la salud humana son un asunto “controvertido científicamente”, añadiendo en su auto que en ninguno de los informes que obran en su poder se establece que sean inocuas.

Tras señalar que sería “presuntuoso y contrario al método científico” que un juez resolviera en una instrucción penal una cuestión que tanta controversia suscita, el titular del Juzgado de Instrucción número dos sostiene que la transmisión de ondas de radiofrecuencia de telefonía puede comportar un riesgo para las personas.

Vemos, pues, que en estos tres casos, la alarma social suscitada por el problema ha sido considerada motivo suficiente para justificar la acción judicial.

En muchos países y ciudades, y últimamente en algunas españolas, se han establecido normas que obligan a situar las antenas de telefonía móvil a 100, 200 e incluso 500 metros de lugares habitados, con especial hincapié en apartarlas de colegios y residencias geriátricas, al sugerir algunos estudios que los niños y los ancianos podrían ser los más afectados por una exposición continuada.

Por su parte, más de quinientos ayuntamientos españoles han paralizado la instalación de antenas para móviles por temor a sus efectos nocivos, ante las protestas de miles de vecinos.⁶ Se trata de un fenómeno no exclusivo de nuestro país, hasta el punto de que el ministro alemán de comunicaciones, Bosch, señaló que “las acaloradas discusiones acerca de la energía nuclear es posible que nos parezcan una suave brisa en comparación con lo que va a representar el tema de las redes de repetidores de telefonía móvil”.

En cuanto al daño físico que se pudiera imputar a este tipo de radiaciones, una pauta del principio de precaución puede darla el hecho de que las compañías de seguros en general se niegan a asegurar los posibles daños que se puedan derivar de la contaminación electromagnética, porque los riesgos son inciertos y, caso de confirmarse, las indemnizaciones podrían ser ciertamente elevadas.

⁶ Así, en Alcañiz (Teruel), se acaba de ejecutar una orden municipal para dejar sin suministro eléctrico dos antenas de telefonía móvil (G. Vivas, “Anulan unas antenas en un colegio de Teruel”, *El Mundo*, 4/01/2002, p. 27); en Salamanca, las asociaciones de vecinos están movilizadas ante unas antenas situadas en el depósito de agua; en el madrileño pueblo de Torrejón de la Calzada, el alcalde ha pedido la retirada de una antena situada en el patio de un colegio, mientras que en Getafe, desde el pasado mes de Junio, no se concede ninguna licencia municipal a las antenas de telefonía “por precaución”.

Además, contamos con el precedente de productos cuyos perjuicios únicamente pudieron demostrarse años después de que se negase que existían, como el amianto o el tabaco, de lo que se deriva la necesidad de una más amplia regulación en la materia y una promoción de la investigación, como ya señalábamos en la Discusión del presente trabajo. A este respecto, cabe señalar que el proyecto CEM de la OMS no expondrá, hasta el año 2005 ó 2006, sus conclusiones acerca de los efectos sobre los seres humanos de los campos electromagnéticos al objeto de fijar límites de exposición uniformes, mientras que las conclusiones del Informe, de Mayo de 2000, del Grupo de Expertos Independientes en Telefonía Móvil, creado por el Ministerio de Sanidad Británico, al igual que el ya mencionado Informe Técnico elaborado por el Comité de Expertos de nuestro país para el Ministerio de Sanidad y Consumo, con fecha de Mayo de 2001, señala que las lagunas en el conocimiento son suficientes para justificar una política de precaución y un uso racional.

Son de tener en cuenta, asimismo, las posibles responsabilidades que pudieran derivarse para las comunidades de propietarios, tanto civiles como administrativas, pues numerosos ayuntamientos han establecido que de las infracciones que se cometan contra la normativa de instalación y conservación de las antenas de telefonía móvil, serán responsables, además de la empresa instaladora, el propietario o comunidad de propietarios del edificio o terreno en que se ubique la antena.

Por último señalar, en lo que a radiaciones de radiofrecuencia atañe y en virtud de lo reciente de la medida, que en el Consejo de Ministros celebrado el 28 de Septiembre de 2001, fue aprobado un Real Decreto que regula los Límites de Exposiciones Radioeléctricas. Este Real Decreto viene a cubrir el vacío legal existente hasta el momento en torno a las antenas de telefonía móvil, que en número de 25.600 se encuentran instaladas en España en una situación de ilegalidad completa, ajenas a cualquier control o inspección⁷. No obstante, las asociaciones de vecinos, consumidores y usuarios manifiestan no estar satisfechas con las citadas medidas, que consideran insuficientes por poco restrictivas, tanto en lo que respecta a las antenas de telefonía móvil como a los tendidos de alta tensión.

De esta manera, y ante la alarma surgida por el caso de Valladolid, el Defensor del Pueblo decidió, el 8 de Enero de 2002, iniciar actuaciones junto con el Ministerio de Ciencia y Tecnología para la revisión del Real Decreto.⁸ Sin embargo, el citado Ministerio manifestó que “no revisará el decreto sobre limitación de radiaciones electromagnéticas, ni lo va a hacer en el futuro”.⁹ Así las cosas, parece que el asunto llegará al Congreso: la polémica sigue, pues, abierta.

⁷ Gustavo Catalán Deus, “El Gobierno revisará antes de nueve meses 25.000 antenas de telefonía móvil”, *El Mundo*, 3/10/2001, p.30.

⁸ Gustavo Catalán Deus, “El Defensor del Pueblo cree que están mal reguladas las antenas”, *El Mundo*, 9/01/2002, p. 27.

⁹ Gustavo Catalán Deus, “Birulés desoye al Defensor del Pueblo sobre las antenas”, *El Mundo*, 10/01/2002, p. 22.